

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA CRISTINA DE JESUS

ESTUDO DA MORFOANATOMIA, COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADES
BIOLÓGICAS E ANTIOXIDANTES DA ESPÉCIE *Oreopanax fulvum* Marchal
(ARALIACEAE)

CURITIBA

2018

CAMILA CRISTINA DE JESUS

ESTUDO DA MORFOANATOMIA, COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADES
BIOLÓGICAS E ANTIOXIDANTES DA ESPÉCIE *Oreopanax fulvum* Marchal
(ARALIACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2018

Jesus, Camila Cristina de

Estudo da morfoanatomia, composição fitoquímica, atividades biológicas e antioxidantes da espécie *Oreopanax fulvum* Marchal (Araliaceae) / Camila Cristina de Jesus – Curitiba, 2018.

97 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Araliaceae. 2. Toxicidade. 3. Antioxidante. 4. Flavonoides. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 583.687



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

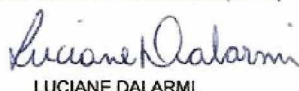
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAMILA CRISTINA DE JESUS** intitulada: **Estudo da morfoanatomia, composição fitoquímica, atividades biológicas e atividades antioxidantes da espécie *Oreopanax fulvum* Marchal (ARALIACEAE)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

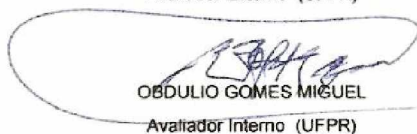
Curitiba, 21 de Fevereiro de 2018.


MARILIS DALLARMI MIGUEL

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


LUCIANE DALLARMI

Avaliador Externo (UFPR)


OBDULIO GOMES MIGUEL

Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e proteção.

À minha família, que foram meu suporte em todos os momentos.

Ao meu noivo Anderson pelo companheirismo.

Aos professores Marilis e Obdulio pela oportunidade, ensinamentos e incentivo no desenvolvimento do trabalho.

A doutoranda Vanessa Bobek pelo apoio no estudo morfoanatômico.

Aos doutorandos Francis e Letícia, pelas análises de RMN e apoio na execução das atividades biológicas e antioxidantes.

Aos mestrandos Natasha Stopinski, Natasha Fabri, Larissa, Aletheia, Mariana, Fernando, Gisele pela amizade, desabafos, ajuda em todas as etapas de execução deste projeto.

À todos os colegas do grupo de produtos naturais.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A espécie *Oreopanax fulvum* Marchal pertencente ao gênero *Oreopanax* e à família Araliaceae, esta planta ocorre na Floresta Atlântica da região sul e sudeste do Brasil. O presente estudo teve como objetivo realizar o estudo morfoanatômico, o estudo fitoquímico, atividades biológicas e antioxidantes das folhas de *Oreopanax fulvum*. O estudo morfoanatômico foi realizado a partir das folhas da espécie utilizando metodologia padrão de microscopia óptica e eletrônica, observando-se que as folhas são hipoestomáticas com estômatos anomocíticos, os quais são comumente encontrados em espécies da família Araliaceae. Obteve-se a partir das folhas o extrato bruto, com 10,52 % de rendimento, o qual foi particionado em soxhlet utilizando os solventes em escala crescente de polaridade obtendo-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente. Na pesquisa preliminar fitoquímica detectaram-se, qualitativamente, flavonoides, esteroides e/ou triterpenos e iridoides na fração etanólica e saponinas e amino grupos na fração aquosa. A fração acetato de etila teve alíquota analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), detectando-se substâncias químicas do tipo flavonoides. O extrato bruto e frações não apresentaram atividade tóxica frente à *Artemia salina*, visto todas as CL_{50} serem $\geq 1000 \mu\text{g/mL}$ e nem atividade hemolítica quando os resultados obtidos foram comparados ao padrão positivo saponina e ao controle negativo PBS. Os ensaios antioxidantes deram destaque à fração acetato de etila, a qual apresentou maior atividade antioxidante dentre as amostras testes pelos dois métodos avaliados, fosfomolibdênio e DPPH. Na análise pelo método do fosfomolibdênio todas as amostras apresentaram potenciais antioxidantes próximos ou superiores estatisticamente ao padrão rutina e pelo método DPPH a fração acetato de etila apresentou IC_{50} de $42,900 \mu\text{g/mL}$.

Palavras-chave: Morfoanatomia. Toxicidade. Antioxidante. Flavonoides.

ABSTRACT

The species *Oreopanax fulvus* Marchal belongs to the genus *Oreopanax* and Araliaceae Family, this plant is originally found in the Atlantic Forest of South and Southeast of Brazil. The presente study had the objective of performing the morphological study, the phytochemical study, the biological and antioxidante activities of *Oreopanax fulvus* leaves. The morphoanatomic study was performed from the leaves, according to the standart methodology of optical and electron microscopy, It was observed that the leaves are hypostomatic with anomocytic stomata, which are commonly found in species of the family Araliaceae. Obtained from the leaves the crude extract, with 10,52% yield, which was divided using solvents in increases the polarity scale, obtaining the hexane, chloroform, ethyl acetate and remaining fractions. By qualitative analysis were detected flavonoids, steroids and/or triterpenes and iridoids in the ethanol fraction and saponins and amino groups in aqueous fractions too. The ethyl acetate fraction was analyzed by a high performance liquid chromatography (HPLC), detecting flavonoid-type chemicals. The crude extract and fractions showed no toxic activity against *Artemia salina* as all LC_{50} are $\geq 1000 \mu\text{g/mL}$ and neither hemolytic activity when the results obtained were compared to the positive saponin standard and the negative control PBS. The antioxidant assays highlighted the ethyl acetate fraction, which presented higher antioxidant activity among the test samples by the two evaluated methods, phosphomolybdenum and DPPH. In the analysis by the phosphomolybdenum method all the samples had potential antioxidants near or higher statistically to the standard rutin and by the DPPH method the ethyl acetate fraction presented IC_{50} of $42,900 \mu\text{g/mL}$.

Keywords: Morphoanatomy. Toxicity. Antioxidant. Flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	OCORRÊNCIA DE <i>Oreopanax fulvum</i>	28
FIGURA 2-	<i>Oreopanax fulvum</i> EM AMBIENTE NATIVO	29
FIGURA 3-	FOLHAS E FRUTOS DE <i>Oreopanax fulvum</i>	29
FIGURA 4-	METODOLOGIA GERAL DO TRABALHO.....	30
FIGURA 5-	VISTA FRONTAL DE <i>Oreopanax fulvum</i>	54
FIGURA 6-	TRICOMAS TECTORES de <i>Oreopanax fulvum</i>	55
FIGURA 7-	SECÇÃO TRANSVERSAL DE <i>Oreopanax fulvum</i>	57
FIGURA 8-	SECÇÃO TRANSVERSAL PECÍOLO DE <i>Oreopanax fulvum</i>	58
FIGURA 9-	CROMATOGRAMA FRAÇÃO 35 - ACETATO DE ETILA	64
FIGURA 10-	ESTRUTURA BÁSICA DO FLAVONOIDE	65

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1-	RESULTADOS DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	67
GRÁFICO 2-	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO COMPLEXO DO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS RELATIVAS À VITAMINA C, RUTINA E BHT	72
GRÁFICO 3-	RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH DE <i>Oreopanax</i> <i>fulvus</i>	74

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1-	COMPOSTOS ISOLADOS/ ATIVIDADES BIOLÓGICAS E/OU FARMACOLÓGICAS DA FAMÍLIA ARALIACEAE	24
QUADRO 2-	TAXONOMIA DA ESPÉCIE <i>Oreopanax fulvum</i>	28
QUADRO 3-	DADOS DA COLETA.....	31
QUADRO 4-	GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO EMPREGADO NAS ANÁLISES DE CLAE/DAD	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	VALORES DE UMIDADE E CINZAS	59
TABELA 2-	PESQUISA PRELIMINAR FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO DA FOLHA	60
TABELA 3-	PESQUISA PRELIMINAR FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA	62
TABELA 4-	DETERMINAÇÕES REALIZADAS NO EXTRATO BRUTO DE <i>Oreopanax fulvum</i>	63
TABELA 5-	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA FOLHA DE <i>Oreopanax fulvum</i>	64
TABELA 6-	RESULTADOS DA TOXIDADE AGUDA FRENTE À <i>Artemia salina</i>	66
TABELA 7-	RESULTADOS DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA	70
TABELA 8-	RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO DO FOSFOMOLIBDÊNIO	71
TABELA 9-	RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH	74

LISTA DE SIGLAS

BHT – Hidroxitolueno butilado.

CDB – Convention on Biological Diversity.

CCD – Cromatografia de Camada Delgada.

CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência.

DAD – Diode Array.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila.

FAC – Fração Acetato de etila.

FCI – Fração Clorofórmio.

FH – Fração Hexano.

FREM – Fração Remanescente.

HPLC - High Performance Liquid Chromatography.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

R_f – Fator de retenção.

SDS – Dodecil sulfato de sódio.

UV – Ultravioleta.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	FAMÍLIA ARALIACEAE	19
3.2	GÊNERO <i>Orepanax</i> sp. E ESPÉCIE <i>Oreopanax fulvus</i>	27
4	METODOLOGIA	30
4.1	OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	31
4.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	32
4.2.1	Preparo das lâminas.....	32
4.2.1.1	Lâminas semipermanentes.....	32
4.2.1.2	Lâminas permanentes	32
4.2.1.2.1	Inclusão em parafina	32
4.2.1.2.2	Inclusão em glicol metacrilato	33
4.2.1.3	Testes microquímicos.....	33
4.2.1.4	Técnica de diafanização ou clareamento	34
4.2.1.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	34
4.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	34
4.3.1	Determinação da umidade	34
4.3.2	Determinação das cinzas totais.....	35
4.4	ENSAIO PRELIMINAR FITOQUÍMICO	35
4.4.1	Extrato etanólico.....	35
4.4.1.1	Pesquisa de metabólitos secundários no extrato etanólico	36
4.4.1.1.1	Pesquisa de alcaloides.....	36

4.4.1.1.2	Pesquisa de leucoantocianidinas	37
4.4.1.1.3	Pesquisa de flavonoides.....	37
4.4.1.1.3.1	Reação de Taubock	37
4.4.1.1.3.2	Ensaio de Pacheco.....	38
4.4.1.1.3.3	Ensaio com zinco em ácido clorídrico	38
4.4.1.1.4	Pesquisa de cumarinas	38
4.4.1.1.5	Pesquisa de substâncias iridoidais	39
4.4.1.1.6	Pesquisa de antraquinonas	39
4.4.1.1.7	Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos	40
4.4.2	Extrato aquoso	41
4.4.2.1	Pesquisa de metabólitos secundários no extrato aquoso.....	41
4.4.2.1.1	Pesquisa de antocianinas.....	41
4.4.2.1.2	Pesquisa de heterosídeos saponínicos	42
4.4.2.1.3	Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos	42
4.4.2.1.4	Pesquisa de taninos	42
4.4.2.1.5	Pesquisa de amino grupos	43
4.4.2.1.6	Pesquisa de ácidos fixos	43
4.4.2.1.7	Pesquisa de ácidos voláteis	44
4.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES.....	44
4.5.1	Determinação do teor de sólidos	45
4.6	IDENTIFICAÇÃO DE GRUPO DE CONSTITUINTE QUÍMICO	45
4.7	TOXICIDADE PRELIMINAR.....	47
4.7.1	Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	47
4.7.2	Atividade hemolítica	48
4.8	ATIVIDADES ANTIOXIDANTES	50
4.8.1	Redução do complexo fosfomolibdênio	50
4.8.2	Redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	51

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	53
5.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	53
5.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	59
5.3.1	UMIDADE E CINZAS	59
5.4	ENSAIO PRELIMINAR FITOQUÍMICO	60
5.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES	63
5.5.1	Obtenção do extrato bruto.....	63
5.5.2	Obtenção das frações	63
5.6	IDENTIFICAÇÃO DE GRUPO DE CONSTITUINTE QUÍMICO	64
5.7	TOXICIDADE PRELIMINAR.....	66
5.7.1	Avaliação da toxicidade aguda frente à <i>Artemia salina</i>	66
5.7.2	Atividade hemolítica	67
5.8	ATIVIDADES ANTIOXIDANTES	71
5.8.1	Redução do complexo fosfomolibdênio	71
5.8.2	Redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	73
6	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS.....	77
	ANEXO 1- DEPÓSITO DE EXSICATA	91
	ANEXO 2 - CURVAS DE DPPH	93

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade entende-se como a variedade entre os organismos vivos de distintas origens - terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos dos quais são integrantes. (CDB, 1992). O desenvolvimento urbano próximo às áreas de floresta tem causado intervenções ambientais que contribuem com mudanças climáticas, as quais colaboram com degradações sobre fauna e flora. Diante dos danos causados aos sistemas naturais há uma perda de espécies em níveis nunca registrados, as quais afetam as interações entre organismos vivos e influenciam no funcionamento saudável dos biossistemas. (PEREIRA et al., 2013).

Apesar da redução dos recursos naturais, o Brasil ainda mantém uma imensa diversidade biológica, a qual tem sido estudada na busca de substâncias com atividades biológicas e farmacológicas relevantes que possam ser empregadas no desenvolvimento de fármacos, cosméticos, agroquímicos e suplementos alimentares. Ressalta-se que o mercado mundial de fitomedicamentos é milionário, entretanto, o Brasil não apresenta produção significativa de medicamentos diante de sua biodiversidade. Este quadro é decorrente da falta de pesquisa científica em todo o processo de desenvolvimento (desde as etapas de isolamento e caracterização de princípios ativos, passando pelos estudos pré-clínicos até os estudos clínicos), a falta de investimentos regulares na área, e uma política de desenvolvimento e de marcos regulatórios burocráticos que restringem o desenvolvimento da área de produtos originários de plantas. (JOLY et al., 2011).

Em relação à família Araliaceae há estudos para diversas plantas. Destacam-se o *Panax ginseng*, planta tradicional na medicina chinesa com atividades anti-inflamatórias, antifadiga, analgésica e na prevenção e tratamento da obesidade (LEE et al., 2016; LEE et al., 2008; WANG et al., 2010) e a *Hedera helix* com atividades anti-inflamatórias, antifúngica e expectorante. (PRESCOTT et al., 2014; SULEYMAN et al., 2003; SANTORO, 2005).

A espécie *Oreopanax fulvus* Marchal pertencente ao gênero *Oreopanax* e a família Araliaceae, apresenta como sinônimos: *Oreopanax grosseserratus* e *Oreopanax permixtus*. Esta planta ocorre na Floresta Atlântica da região Sul e Sudeste do Brasil. (OREOPANAX FULVUS MARCHAL, 2016).

Com o levantamento bibliográfico realizado para o presente trabalho não encontrou-se estudos fitoquímicos para a espécie *Oreopanax fulvus*.

Diante da importância científica e econômica dos metabólitos até o momento identificados na família Araliaceae há interesse técnico científico em buscar possíveis metabólitos da referida espécie. Ainda, ressalta-se que a pesquisa de novos produtos naturais, a partir de plantas, pode contribuir para o aumento da obtenção de fitoprodutos originários da biodiversidade brasileira e suprir a perda de recursos naturais decorrentes da degradação dos sistemas naturais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo morfoanatômico, o estudo fitoquímico, atividades biológicas e antioxidantes da espécie *Oreopanax fulvum* Marchal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o estudo morfoanatômico das folhas da espécie;
- Avaliar parâmetros físico-químicos;
- Preparar o extrato etanólico bruto e as frações da folha;
- Realizar a pesquisa fitoquímica do extrato bruto e frações;
- Identificar grupos de compostos químicos presentes nas folhas por meio de técnicas cromatográficas;
- Avaliar a atividade hemolítica do extrato bruto e frações da folha;
- Avaliar a atividade citotóxica por meio do bioensaio da *Artemia salina* do extrato bruto e frações da folha;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto e frações da folha.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FAMÍLIA ARALIACEAE

A família Araliaceae está presente em todo território brasileiro, sendo frequentemente encontrada nas regiões Indo-malaia, Australásia e na América tropical, apresentando cerca de 40 gêneros e 1500 espécies. São plantas distribuídas nas regiões de clima temperado, subtropical e em sua maioria tropical, trepadeiras e raramente herbáceas (por exemplo, o gênero *Hydrocotyle*), com folhas largas, pecíolo longo e alargado na base, alternas, simples ou compostas e inflorescências grandes tipo umbela. Flores actinomórficas e frutos carnudos tipo drupa ou baga. (AGUIAR, 2013; SILVA et al., 2009; JOLY, 1987; MENEZES et al., 2007).

Espécies como as do gênero *Hedera sp.*, *Aralia sp.*, *Polyscias sp.*, *Fatsia sp.* e *Schefflera sp.* são cultivadas com a finalidade ornamental. (MENEZES et al., 2007).

As plantas da família Araliaceae apresentam em sua composição química poliacetilenos como, por exemplo, o faltarinol. (BERNART et al., 1996). Estudos químicos e farmacológicos têm indicado que as saponinas triterpênicas são importantes bioativos desta família. Saponinas isoladas e identificadas foram reportadas por terem atividades farmacológicas, incluindo, o aumento da eficiência mental e a estimulação do metabolismo. (TOMMASI et al., 1997).

Dentro da família Araliaceae destacam-se a Hera (*Hedera helix*), uma espécie europeia, e o ginseng (*Panax ginseng*).

Estudos fitoquímicos e farmacológicos destas plantas caracterizaram saponinas, triterpenos e compostos acetilênicos, sendo que a atividade farmacológica do *Panax ginseng* e o efeito secretolítico da *Hedera helix* são relacionados às saponinas triterpênicas denominadas, respectivamente, de ginsenosídeos e hederasaponinas. (FAKIM, 2006).

O *Panax ginseng* é o ginseng coreano e o *Panax quinquefolius* o ginseng americano. (BREEMEN et al., 1995). O *Panax quinquefolius* é indicado para tratar a fadiga e é um imunoestimulante. Estudos experimentais demonstraram atividades estrogênicas, antimutagênica e hipoglicêmica e também no melhoramento da memória e aprendizado, sendo estas atividades associados aos bioativos já isolados como poliacetilenos, polissacarídeos e os ginsenosídeos. (ASSINEWE et al., 2003). Eguale et al. (2007), descreveu atividade anti-helmíntica *in vivo* e *in vitro* contra ovos e parasitas adultos de *Haemonchus contortus* dos extratos aquoso e hidroalcoólico de *Hedera helix*.

Na medicina tradicional chinesa a espécie *Acanthopanax gracilistylus* é utilizada para dissipar “ventos patogênicos” e fortalecer o corpo, a espécie *Acanthopanax senticosus* trata a neurastenia, hipertensão e doença cardíaca isquêmica, sendo que as saponinas têm sido citadas como responsáveis por efeitos farmacológicos como, por exemplo, a redução de infarto agudo do miocárdio em cachorros com doença isquêmica do coração e a *Acanthopanax sessiliflorus* é indicada na artrite reumatoide, diabetes, tumores, hipertensão e doenças vasculares cerebrais. Estudos fitoquímicos têm apresentado isolamento de glicosídeos triterpenos do tipo lupano das folhas e caules das espécies do gênero *Acanthopanax* sp., sendo que os triterpenóides e lignanas são indicadas como as substâncias responsáveis pelas atividades biológicas deste gênero. (WU et al., 2014; JIANG et al., 2006; LEE et al., 2012).

Outra espécie do gênero é a *Acanthopanax koreanum*, um arbusto endêmico na Coreia, na qual sua raiz e caule têm sido utilizados na medicina oriental tradicional como tônico, profilático, para tratar reumatismo, paralisia, hepatite e diabetes. (NHIEM et al., 2010).

Tratando-se do gênero *Aralia* sp., a *Aralia cordata* é uma planta medicinal distribuída na Coreia, Japão e China, cuja a raiz está associada ao tratamento de reumatismo, lombalgia, e, também demonstrou efeito analgésico, hipotérmico e prolongamento do efeito da anestesia por pentobarbital, sendo que os diterpenoides já foram descritos na literatura como os responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios e analgésicos. (CHO et al., 2009).

Já a *Aralia continentalis* é tradicionalmente prescrita na Coreia para aliviar a dor, reumatismo e lombalgia, a *Aralia dasyphylla* como tônico e no tratamento da hepatite e diabetes, a casca da espécie *Aralia elata* utiliza-se contra a tosse, câncer e também na doença diabética e a *Aralia spinifolia* apresenta efeitos tônicos e é indicada para tratamento de neuroses. (JEONG et al., 2012; YU et al., 1994; XIAO et al., 1999; KANG et al., 1999).

A *Cussonia arborea* é vastamente distribuída na savana africana, distintas partes dessa planta são utilizadas no tratamento de injúria dos olhos, paralisia, epilepsia, convulsões, espasmos, doenças venéreas, diarreia, vertigem, infertilidade feminina, sendo que fitoquimicamente já foram identificados classes de composto como saponinas triterpênicas, glicosídeos triterpenos e flavonoides. (KOUGAN et al., 2009). *Cussonia bancoensis* é uma árvore que atinge a altura de 15 a 25 metros, encontrada na região da Nigéria, sendo utilizada na medicina tradicional nigeriana no tratamento de tonturas e infertilidade feminina. Desta espécie já foram identificadas flavonoides e saponinas triterpênicas. (TAPONDJOU et al., 2003).

No Egito encontra-se o gênero *Dizygotheca sp.* e a espécie *Meryta lanceolata*, as quais são cultivadas como ornamentais. (MELEK et al., 2004; MELEK et al., 2003).

Fatsia sp. é um gênero que possui três espécies: *Fatsia japonica*. *Fatsia polycarpa* e *Fatsia oligocarpella*. A *Fatsia japonica* é nativa do Japão e comumente cresce como uma planta ornamental. A espécie *Fatsia polycarpa* são arbustos perenes encontradas comumente em florestas sombrias em altitudes medianas, entre 2000 a 2800 metros. Estas plantas têm sido utilizadas na medicina tradicional, na chinesa as folhas e raízes são utilizadas para tratar a tosse, artralgia reumática, gota e fraturas. Os constituintes químicos da *Fatsia japonica* já foram relatados, as folhas, frutos e flores são ricos em triterpenoides glicosídeos. (CHENG et al., 2011; YE et al., 2014).

Hydrocotyle umbellata L. é uma espécie nativa no Brasil e é comumente conhecida como acariçoba e tem sido utilizada na medicina popular para reduzir a ansiedade. (ROCHA et al., 2011).

A espécie *Kalopanax pictus* é uma árvore decídua, a qual cresce nos países do leste asiático, a casca da raiz desta planta tem sido utilizada na medicina tradicional para tratar artrite reumatoide, dor neurótica e diabetes melitus. Na sua composição fitoquímica identificou-se na casca da raiz a presença de glicosídeos hederageninas, siringina, liriodendrina, coniferaldeídos e, ainda demonstrou-se que o extrato metanólico possui atividades citotóxicas, antidiabética e anti-inflamatória. (QUANG et al., 2011).

O gênero *Oplopanax* sp. contém classes de compostos bioativos identificados como as lignanas, saponinas, sesquiterpenos, poliacetilenos e antraquinonas. *Oplopanax horridus*, é uma planta norte americana, importante entre tribos nativas da região do Alaska, pois é utilizada em rituais xamanistas. Seu nome popular é clube do diabo, sendo a parte entrecasca e raízes utilizadas para o tratamento de diabetes, reumatismo, tuberculose, resfriados, dor de cabeças e hemorragias pulmonares. Os polienos identificados nesta planta foram relatados como possuidores de atividades antimicobactérias e antifúngicas. (KOBALSY et al., 1997; INUI et al., 2010). A espécie *Oplopanax elatus* tem sido utilizada na medicina tradicional coreana e chinesa com propósito anti-inflamatório e analgésico, sendo que foram identificadas nesta planta saponinas, antraquinonas, lignina antipsoríase e óleo essencial com atividade antibacteriana. (YANG et al., 2010).

Polyscias fulva é uma árvore encontrada na região central da África. Há relatos que a cocção da casca do caule é utilizada por via oral para curar doenças venéreas, enquanto que a pasta do caule e folhas é utilizada topicamente contra dermatoses. (BEDIR et al., 2001; NJATENG et al., 2015). Tratando-se da *Polyscias scutellaria*, é um arbusto encontrado nos países do pacífico, sendo utilizado como anti-inflamatório. (PAPHASSARANG et al., 1989).

No gênero *Schefflera* sp. incluem-se em volta de 200 espécies, as quais estão distribuídas em regiões tropicais, sendo seus principais constituintes químicos as saponinas triterpênicas, esteroides glicosídeos e ácidos orgânicos. (WANG et al., 2014). A *Schefflera arboricola* é uma planta ornamental que atinge em média de 2 a 3 metros de altura, estudos do extrato etanólico desta planta demonstraram atividades sedativas, hipnóticas, analgésica, anticonvulsionante, relaxante da musculatura. (MELEK et al., 2003).

A espécie *Schefflera divaricata* é uma planta utilizada na medicina tradicional no tratamento do reumatismo e como tônico. (TOMMASI et al., 1997). Já a *Schefflera venulosa* é distribuída na China e é usada na medicina tradicional para tratar artrite reumatoide e dor de cabeça. (PENG et al., 2015).

A planta *Tetrapanax papyriferus* trata-se de um arbusto distribuído ao longo das colinas do Taiwan e no sul da China, sendo utilizado na medicina tradicional chinesa para tratar inflamação e disenteria. (HO et al., 2005).

Trevesia palmata é uma planta nativa da Índia e é usada na medicina tradicional como tônico e a *Trevesia sundaica* para tratar o reumatismo e como tônico. (TOMASSI et al., 2000; TOMMASI et al., 1997).

No quadro seguinte (QUADRO 1) estão apresentadas algumas das espécies da família Araliaceae, as classes de compostos identificados e suas atividades biológicas e/ou farmacológicas, quando realizadas.

QUADRO 1 – COMPOSTOS ISOLADOS/ ATIVIDADES BIOLÓGICAS E/OU FARMACOLÓGICAS DA FAMÍLIA ARALIACEAE – CONTINUA

PLANTA	PARTE UTILIZADA	TIPO DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	ATIVIDADE	REFERÊNCIA
<i>Acanthopanax gracilistylus</i>	Casca da raiz	Diterpenóides	Anti-inflamatória	WU et al., 2014
<i>Acanthopanax koreunum</i>	Casca da raiz	Diterpenóides	-	KIM et al., 1988
	Folhas	Glicosídeos triterpênicos tipo lupano	Imunomodulador	NHIEM et al., 2010
<i>Acanthopanax nipponicus</i>	Folhas	Saponinas triterpênicas	-	MIYAKOSHI et al., 1999
<i>Acanthopanax senticosus</i>	Folhas	Glicosídeos triterpênicos	-	PARK et al., 2000
		Saponinas triterpênicas	Inibição da lipase pancreática	JIANG et al., 2006
<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	Folhas	Saponinas triterpênicas	Inibição da lipase pancreática	YOSHIZUMI et al., 2006
	Frutos	Glicosídeos triterpênicos	-	LEE et al., 2012
<i>Aralia cordata</i>	Partes aéreas	Ácido oleânico	Anti-isquêmica	CHO et al., 2009
<i>Aralia dasyphylla</i>	Casca da raiz	Saponina triterpênica	Citotoxicidade	XIAO et al., 1999
<i>Aralia elata</i>	Casca da raiz	Cerebrosídeo	-	KANG et al., 1999
<i>Aralia spinifolia</i>	Raízes	Saponinas triterpênicas	-	YU et al., 1994
<i>Cussonia arborea</i>	Casca da árvore	Saponinas triterpênicas	-	KOUGAN et al., 2009
<i>Cussonia bancoensis</i>	Casca do caule	Saponinas triterpênicas	Inibição dos efeitos do NO (óxido nítrico)	TAPONDJOU et al., 2003
<i>Cussonia racemosa</i>	Folhas	Glicosídeos diterpênicos	-	LIVA et al., 2002
<i>Dizygotheca kerchoveana</i>	Folhas e caule	Saponinas triterpênicas	-	MELEK et al., 2004
<i>Fatsia japonica</i>	Frutos, folhas, flores, raízes, ramo, caule	Glicosídeos triterpênicos	-	YE et al., 2014
<i>Fatsia polycarpa</i>	Folhas e galhos	Triterpenóides do tipo oleanano	-	CHENG et al., 2011
<i>Hedera helix</i>	Folhas	Saponinas triterpênicas	-	ELIAS et al., 1991
	Frutos	Saponinas triterpênicas	-	BEDIR et al., 2000
	Frutos	Poliacetilenos	-	CHRISTENSEN et al., 2001

QUADRO 1 – COMPOSTOS ISOLADOS/ ATIVIDADES BIOLÓGICAS E/OU FARMACOLÓGICAS DA FAMÍLIA ARALIACEAE – CONTINUAÇÃO

PLANTA	PARTE UTILIZADA	TIPO DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	ATIVIDADE	REFERÊNCIA
<i>Kalopanax pictus</i>	Casca da raiz	Saponinas triterpênicas	Anti-inflamatória	QUANG et al., 2011
<i>Meryta denhamii</i>	Partes aéreas	Saponinas oleânicas	Antiproliferativa	CIOFFI et al., 2008
<i>Meryta lanceolata</i>	Folhas e caules	Saponina oleânica	-	MELEK et al., 2004
		Saponinas triterpênicas	-	MELEK et al., 2003
<i>Oplopanax horridus</i>	Entrecasca	Polienos	Atividade antimicrobiana	KOBAISY et al., 1997
	Entrecasca	Sesquiterpenos	-	INUI et al., 2010
<i>Oreopanax guatemalensis</i>	Folhas e tronco	Saponinas triterpênicas	-	MELEK et al., 2002
<i>Panax ginseng</i>	Raízes	Poliacetilenos	Inibição da acetilcolinesterase	RHO et al., 2005
	Raízes	Hidrocarbonos sesquiterpenos	-	RICHTER et al., 2005
<i>Panax notoginseng</i>	Raízes	Saponinas triterpênicas	-	HAN et al., 2014
<i>Panax quinquefolium</i>	Raízes	Poliacetilenos	-	FUJIMOTO et al., 1993
<i>Panax quinquefolius</i>	Raízes	Saponinas triterpênicas	-	BREEMEN et al., 1995
<i>Panax ginseng</i>				
<i>Polyscias fulva</i>	Folhas	Triterpenos glicosídeos	-	BEDIR et al., 2001
	Casca do caule	Saponina triterpênica	Antifúngica	NJATENG et al., 2015
<i>Polyscias scutellarza</i>	Folhas	Saponinas triterpênicas	-	PAPHASSARANG et al., 1989
<i>Polyscias scutellarza</i>	Folhas	Glicosídeo oleânico	-	PAPHASSARANG et al., 1990
<i>Schefflera arboricola</i>	Folhas e tronco	Saponinas triterpênicas	-	MELEK et al., 2003
<i>Schefflera bodinieri</i>	Raízes	Glicosídeos triterpênicos	-	ZHU et al., 1996
<i>Schefflera divaricata</i>	Folhas e flores	Saponinas triterpênicas	-	TOMMASI et al., 1997

QUADRO 1 – COMPOSTOS ISOLADOS/ ATIVIDADES BIOLÓGICAS E/OU FARMACOLÓGICAS DA FAMÍLIA ARALIACEAE – CONCLUSÃO

PLANTA	PARTE UTILIZADA	TIPO DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	ATIVIDADE	REFERÊNCIA
<i>Schefflera heptaphylla</i>	Casca do caule	Saponinas triterpênicas	-	WU et al., 2014
<i>Schefflera impressa</i>	Tronco e casca	Triterpeno ácido	-	SRIVASTAVA, 1992
<i>Schefflera impressa</i>	Tronco e casca	Saponina acetilada	-	SRIVASTAVA, 1989
<i>Schefflera kwangsiensis</i>	Partes aéreas	Saponinas triterpênicas	-	WANG et al., 2014
<i>Schefflera octophylla</i>	Folhas	Saponina bidesmosídica	-	SUNG et al., 1992
<i>Schefflera venulosa</i>	Folhas	Sesquiterpenos e triterpenoides	-	PENG et al., 2015
<i>Tetrapanax papyriferus</i>	Flores e frutos	Flavonóides e derivados de benzeno	-	HO et al., 2005
<i>Trevesia palmata</i>	Folhas	Saponinas triterpênicas	Antiproliferativa	TOMMASI et al., 2000
<i>Trevesia sundaica</i>	Folhas e flores	Saponinas triterpênicas	-	TOMMASI et al., 1997
<i>Tupidanthus calyptratus</i>	Folhas	Saponinas triterpênicas	-	CIOFFI et al., 2001

FONTE: A Autora (2016).

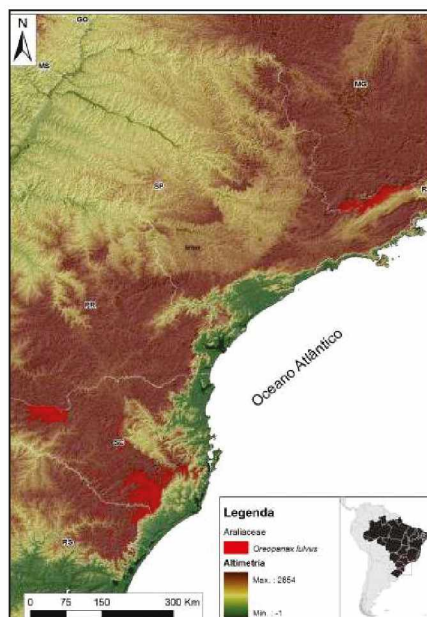
3.2 GÊNERO *Oreopanax* sp. E ESPÉCIE *Oreopanax fulvus*

No gênero *Oreopanax* sp. encontra-se árvores peludas e arbustos, os quais são comuns em florestas andinas com elevadas altitudes. A espécie *Oreopanax palamophyllus* está presente em florestas tropicais úmidas montanhosas, *Oreopanax xalapensis* em florestas tropicais montanhosas secundárias, *Oreopanax capitatus* é frequentemente encontrada na Costa Rica, *Oreopanax xalapensis* é comum em florestas secundárias. (MARCHANT et al., 2002). São em torno de 150 espécies neotropicais, sendo encontradas principalmente na América Central e dos Andes, principalmente, em florestas montanhosas. (CARVALHO, 2014).

Há espécies do referido gênero que são cultivadas como ornamentais em jardins públicos do Egito e são conhecidas como ricas em saponinas. (MELEK et al., 2002).

A espécie *Oreopanax fulvus* é conhecida popularmente como figueira-do-mato (AGUIAR et al., 2012), tamanqueira (GRINGS; BRACK, 2008), embauvarana (SAUERESSIG, 2012), mandioqueira, figueira-brava e mamona-do-mato. A planta é arbustiva a arbórea, de padrão foliar semidecíduo, sendo que as árvores podem ter até 12 metros de altitude. No estado do Paraná a floração ocorre de dezembro a fevereiro e a frutificação (frutos maduros) de junho a julho. (CARVALHO, 2014).

A espécie está distribuída nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Na figura exposta na sequência (FIGURA 1) estão indicados os locais de maior ocorrência de *Oreopanax fulvus*.

FIGURA 1 – OCORRÊNCIA DE *Oreopanax fulvus*

FONTE: *Oreopanax Fulvus* Marchal (2016).

A seguir, no quadro 2, está apresentado a classificação taxonômica da espécie em estudo.

QUADRO 2 – TAXONOMIA *Oreopanax fulvus*

DIVISÃO	Angiospermae
CLASSE	Euasterídeas II
ORDEM	Apiales
FAMÍLIA	Araliaceae
GÊNERO	<i>Oreopanax</i>
ESPÉCIE	<i>Oreopanax fulvus</i> Marchal

FONTE: Carvalho (2014).

As figuras 2 e 3 apresentam, respectivamente, a espécie em ambiente nativo e os frutos e folhas.

FIGURA 2 - *Oreopanax fulvum* EM AMBIENTE NATIVO



FONTE: A autora (2016).

FIGURA 3 – FOLHAS E FRUTOS DE *Oreopanax fulvum*

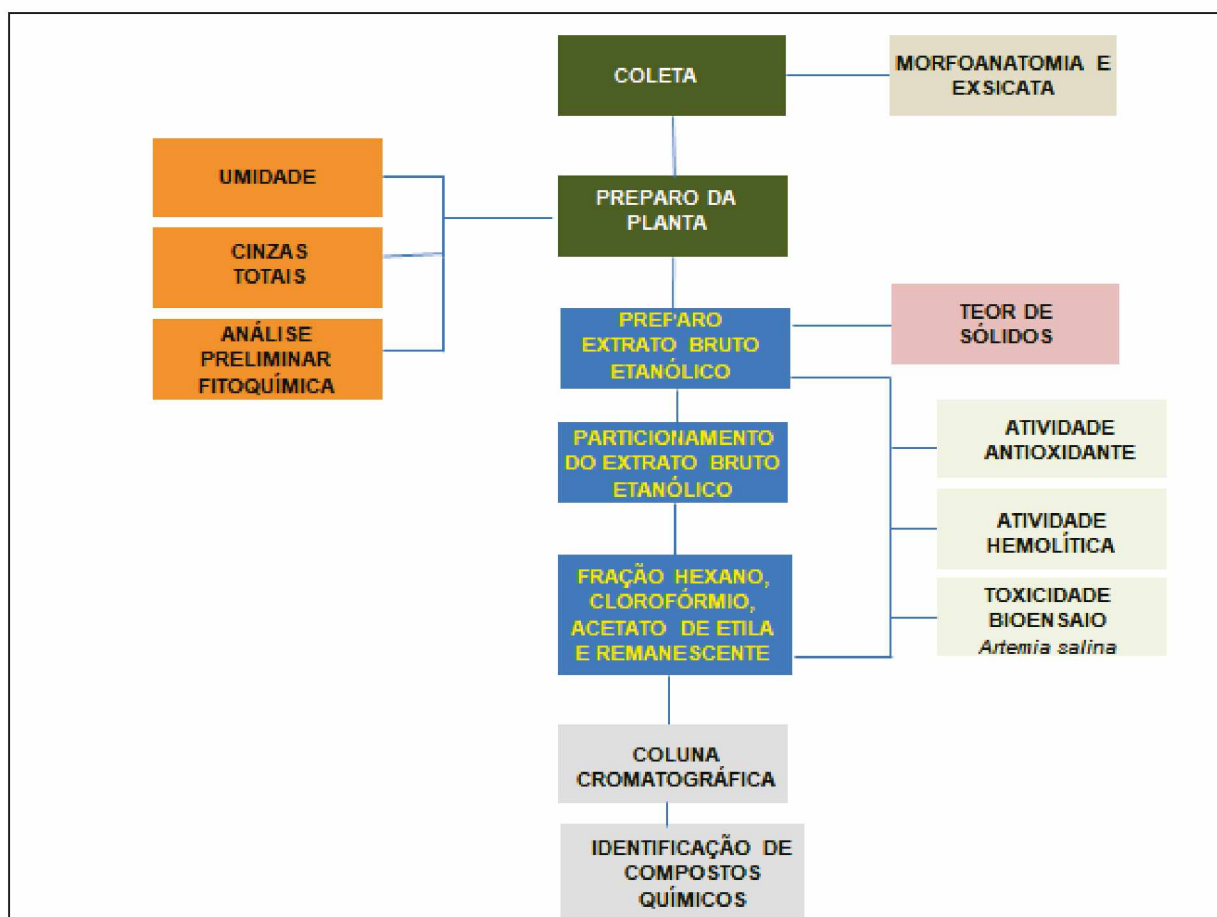


FONTE: Carvalho (2014).

4 METODOLOGIA

O presente trabalho seguiu-se conforme esquema apresentado na figura 4.

FIGURA 4 – METODOLOGIA GERAL DO TRABALHO



FONTE: O autor (2017).

4.1 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Na sequência, quadro 3, estão apresentados os dados referentes à coleta e identificação do material botânico em estudo. Em anexo (ANEXO 1), encontra-se a declaração de depósito de exsicata.

QUADRO 3 – DADOS DE COLETA

DADOS DA COLETA	
Local	Capão do Cifloma, Campus Jardim Botânico, UFPR
Quem identificou	José Tadeu Weidlich Motta Curador do Herbário MBM (Museu Botânico Municipal)
Coordenadas geográficas	25° 26' e 49° 14' W
Data da coleta	Dia 08 de abril de 2016
Parte coletada	Folha, Caule e Fruto
Quantidade total coletada	4 Kg
Exsicata	MBM-389669

A utilização da espécie vegetal *Oreopanax fulvum*, possui autorização das atividades de acesso ao patrimônio genético expedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) através do projeto “Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais” constante no processo de nº 02001.001165/2013-47.

O material botânico após a coleta foi separado em partes aéreas (folha, caule e fruto), sendo que para a referida pesquisa utilizou-se a parte folha. Então, a folha foi seca em temperatura ambiente por um período de 10 dias, para estabilização desse material. Após a secagem e estabilização, o material vegetal folha foi fragmentada em moinho de facas e martelos e submetida à determinação de umidade e cinzas totais e, então, armazenada ao abrigo da luz e da umidade.

4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

A pesquisa referente aos caracteres farmacobotânicos foram efetuados com as folhas de *Oreopanax fulvum*. Fixou-se o material em solução de FAA (90% de etanol a 70%, 5% de formaldeído 37% e 5% de ácido acético glacial) onde o material permaneceu em solução por 7 dias. Na sequência, retirou-se o mesmo da etapa de fixação e então se conservou o material botânico em solução de etanol a 70% até a realização do estudo morfoanatômico. (CAPUTO et al., 2011).

4.2.1 Preparo das lâminas

4.2.1.1 Lâminas semipermanentes

Prepararam-se as lâminas semipermanentes por meio de secções transversais e longitudinais, à mão livre (OLIVEIRA; AKISUE, 1997), sendo os cortes corados com azul de astra, fucsina básica e azul de toluidina. (O'BRIEN; FEDER; McCULLY, 1964). Para a montagem das lâminas utilizou-se glicerina a 50% (BERLYN e MIKSCHE, 1976) e a lutagem realizou-se com esmalte incolor. (BEÇAK; PAULETTE, 1976).

4.2.1.2 Lâminas permanentes

4.2.1.2.1 Inclusão em parafina

O material previamente fixado e armazenado em álcool etílico 70 foi seccionado no plano transversal em micrótomo rotatório Spencer 820, obtendo-se secções de 7-9 µm. As secções foram hidratadas, distendidas em lâminas e secas em mesa térmica a 40°C. (CAPUTO et al., 2011).

Para a coloração empregou-se azul de astra e fucsina básica. (ROESER, 1972). Como meio de montagem foi usado o Entellan®.

4.2.1.2.2 Inclusão em glicol metacrilato

O material fixado foi desidratado em série etanólica crescente (80% e 95% v/v), com intervalo de duas horas cada. Na pré-infiltração, utilizou-se álcool etílico a 95% e resina à vácuo. O material foi infiltrado, por quatro dias, em glicol-metacrilato da marca Leica Historesin®.

Depois de emblocados, foram obtidos cortes finos com o auxílio de micrótomo de rotação Olympus CUT 4055, obtendo-se secções de 7-9 µm. As secções foram coradas com azul de toluidina e montadas em resina sintética Permont®. (BRITO; ALQUINI, 1996).

4.2.1.3 Testes microquímicos

Para os testes microquímicos foram feitas secções transversais à mão livre do material fixado e utilizados os reativos, cloreto férrico para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940), Sudam III para detecção de lipídeos (SASS, 1951), floroglucina clorídrica para a verificação de lignina (FOSTER, 1949), lugol para amido (BERLYN; MIKSCHE, 1976), e ácido sulfúrico para a investigação da natureza dos cristais. (OLIVEIRA; AKISSUE, 1997). Registrou-se os resultados por meio de fotomicrografias em microscópio óptico Olympus CX-31 acoplado à câmera digital Olympus C7070.

4.2.1.4 Técnica de diafanização ou clareamento

O material vegetal seccionado foi mantido em água, na sequência foi clarificado em placa de Petri, utilizando como alvejante uma solução de hipoclorito de sódio por um período de 24 horas. Após o clareamento da amostra lavou-se em água destilada por seis vezes de 15 em 15 minutos. Para neutralizar o pH, lavou-se o material em uma solução de ácido acético a 5%, em água destilada e então corado com safranina 1%. Efetuou-se o processo de montagem da lâmina com glicerina a 50%. (FUCHS, 1963).

4.2.1.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para esta análise, as amostras foram fixadas em FAA 70, desidratadas em série etanólica crescente e pelo ponto crítico e então, realizou-se a metalização da amostra. Sendo utilizados para ponto crítico o equipamento Balzers CPD 030 e metalização com ouro no aparelho Balzers Sputtering SDC 030 e as eletromicrografias foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6360 LV.

4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.3.1 Determinação da umidade

Para a determinação da umidade utilizou-se o método gravimétrico, conforme Farmacopeia Brasileira V edição (2010). Em cadinho de porcelana, previamente seco e pesado, adicionou-se 2 g do material seco e moído, em sexplicata. Em seguida, pesaram-se e colocaram-se os cadinhos com o material para secagem em estufa a 100-105 °C por um período de 5 h, então os mesmos foram resfriados em dessecador por 30 minutos, e novamente pesados.

Repetiu-se o processo de secagem até peso constante, não diferindo por mais de 5 mg entre as duas últimas pesagens.

4.3.2 Determinação das cinzas totais

A determinação de cinzas totais seguiu-se conforme o preconizado na Farmacopeia brasileira V edição (2010). Na primeira etapa, em sextuplicata, os cadinhos de porcelana foram calcinados em mufla a 600 °C por 30 minutos e resfriados em dessecador a temperatura ambiente.

Em cada cadinho adicionou-se 3 g do material seco e moído, os quais na sequência foram pesados e calcinados em mufla a 600 °C por 6 h e então novamente resfriados em dessecador e então pesados. Calculou-se a porcentagem de cinzas em relação ao material seco.

4.4 ENSAIO PRELIMINAR FITOQUÍMICO

4.4.1 Extrato etanólico

Para a preparação do extrato etanólico, 40 gramas do material vegetal seco e triturado foi submetido ao processo de maceração á quente (70 °C) em banho-maria por um período de 1 hora, com 200 mL de etanol a 70%. Em seguida, filtrou-se o extrato obtido e completou-se o volume com o líquido extrator para 200 mL. Concentrou-se o extrato etanólico até adquirir 1/3 de seu volume com o intuito de eliminar o excesso de etanol.

Realizou-se o fracionamento com hexano, clorofórmio e acetato de etila, solventes em ordem crescente de polaridade. Separadamente, agitou-se, 20 mL de cada solvente num total de 10 vezes com o extrato etanólico concentrado em funil de separação e então se completou o volume com o próprio solvente para 200 mL.

O resíduo do extrato constituiu-se a fração hidroalcoólica remanescente, tendo seu volume completado para 200 mL com etanol a 70 %. Estas frações foram utilizadas para pesquisa de alcaloides, leucoantocianidinas, flavonoides, cumarinas, substâncias iridoidais, antraquinonas, esteroides e triterpenos.

4.4.1.1 Pesquisa de metabólitos secundários no extrato etanólico

4.4.1.1.1 Pesquisa de alcaloides

Para a referente pesquisa 50 mL de cada fração (hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica), foram levados à secar em banho-maria (70 °C) e então dissolvidos com 1 mL de etanol e acrescidos de 20 mL de ácido clorídrico a 1%.

Na sequência, transferiu-se 5 mL de cada fração para três tubos de ensaio e procedeu-se a pesquisa de alcaloides utilizando duas gotas dos seguintes reativos: de Mayer - observando a formação de precipitado branco ou turvação branca, de Dragendorff – precipitado de coloração tijolo e de Bouchardat – formação de precipitado de coloração alaranjada.

4.4.1.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

As frações hexano, clorofórmio, acetato de etila foram submetidos a secura em banho-maria (10 mL de cada fração) e recuperados com 5 mL de álcool etílico, sendo que 5 mL de fração hidroalcoólica foram diretamente transferidos a uma cápsula de porcelana. Seguidamente, a todas as frações adicionou-se 5 gotas de ácido clorídrico concentrado e então foram aquecidas até a ebulição. O desenvolvimento de coloração vermelha indica reação positiva.

4.4.1.1.3 Pesquisa de flavonoides

Transferiu-se 20 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila para cápsulas de porcelana, levou-se a secura em banho-maria a 70 °C e dissolveu-se o resíduo em 10 mL de etanol. Então, 5 mL de cada um destas frações e 5 mL da fração hidroalcoólica foi transferido para tubos de ensaio.

Nestes também adicionou-se 200 mg de limalha de magnésio e adicionou-se ácido clorídrico fumegante, considerou-se reação positiva o desenvolvimento de coloração amarela a vermelho para flavona, vermelho a vermelho-sangue para flavonol e diidroflavonol, vermelho tornando-se rosa para derivados antociânicos. Ressalta-se que chalconas, auronas, diidrochalconas, isoflavonas, isoflavononas e flavononas não apresentam coloração nesta reação.

4.4.1.1.3.1 Reação de Taubock

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL de cada fração. Ao resíduo foi adicionado 5 gotas de acetona e 30 mg de ácido bórico misturado com ácido oxálico na proporção 1:1, agitou-se e levou-se novamente à secura. Ao resíduo adicionou-se 5 mL de éter etílico e transferiu-se os respectivos resíduos para tubos de ensaio para verificação de fluorescência.

A presente reação determina aparecimento de fluorescência amarela esverdeada para flavonóis, flavanonas e isoflavonas não apresentam fluorescência e os compostos antociânicos coram-se, mas não produzem fluorescência.

4.4.1.1.3.2 Ensaio de Pacheco

Para este ensaio transferiu-se 10 mL das quatro frações avaliadas para cápsulas de porcelana e então foram levados à secura em banho-maria, seguidamente, aqueceu-se o resíduo em um fogareiro, adicionaram-se cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético e de ácido clorídrico concentrado. O desenvolvimento de coloração roxa é positivo para diidroflavonois.

4.4.1.1.3.3 Ensaio com zinco em ácido clorídrico

As frações hexano, clorofórmio e acetato de etila foram levados à secura em banho-maria a 70 °C e os resíduos dissolvidos em 10 mL de etanol, 5 mL de cada um dos destes extratos mais 5 mL da fração hidroalcoólica para tubos de ensaio. No próximo passo, adicionou-se pastilha de zinco e lentamente ácido clorídrico fumegante, reação positiva para diidroflavonol no caso de aparecimento de coloração violeta.

4.4.1.1.4 Pesquisa de cumarinas

As frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, num volume de 30 mL, foram concentradas até 5 mL. Já a fração hidroalcoólica foi acidificada até pH 1, com HCl 2 N, reduzida de 30 mL para 5 mL em chapa, esfriado e extraiu-se duas vezes com éter de etílico (10 mL), sendo as frações etéreas reunidas e concentradas a 5 mL em banho-maria.

Seguidamente, transferiu-se para tubos de ensaio 3 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e etérea, adicionou-se 2 mL de NaOH 1 N e os tubos de ensaios foram submetidos a câmara de luz ultravioleta em 366 nm, por um período de 15 minutos. Reação positiva caso ocorra aparecimento de fluorescência azul ou verde amarelada.

Os 2 mL restantes de cada fração foram depositados em três pontos previamente marcados com grafite em um papel de filtro, com a obtenção de manchas de aproximadamente 1 cm de diâmetro. No ponto 1 e 2, adicionou-se 1 gota de solução de NaOH 1 N e a mancha 1 foi coberta com uma moeda. Manteve-se o papel de filtro em câmara de luz ultravioleta em 366 nm, por um período de 15 minutos. No caso de reação positiva observa-se no ultravioleta o aparecimento de fluorescências com coloração azul ou verde amarelada na mancha 2.

4.4.1.1.5 Pesquisa de substâncias iridoidais

Para substâncias iridoidais transfere-se 6 mL de cada fração (hexano, clorofórmio e acetato de etila) para três tubos de ensaio, 2 mL em cada tubo. No primeiro tubo adiciona-se cristais de floroglucinol e HCl (ácido clorídrico) concentrado. O aparecimento de coloração verde escura identifica positividade da reação para a presença de substâncias iridoidais. No segundo tubo adiciona-se 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado, o aparecimento de coloração rosa violáceo identifica positividade da reação. No último tubo adiciona-se 0,5 mL de solução alcoólica de vanilina a 1% e duas gotas de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) concentrado, a positividade da reação é verificada pelo aparecimento de coloração rosa cereja.

4.4.1.1.6 Pesquisa de antraquinonas

Transferiu-se para um balão de fundo chato com 250 mL de capacidade, 30 mL de cada fração avaliada e 5 mL de solução aquosa a 10% de ácido sulfúrico.

Acoplou-se o balão a um condensador de bolas e levou-o a refluxo por 30 minutos. Ao obtido, adicionou-se 30 mL de água destilada e separou-se a fração orgânica da aquosa em funil de separação, sendo que a fração hidroalcoólica foi extraída com éter etílico (2 vezes de 10 mL).

Na sequência, concentrou-se os extratos até 5 mL e transferiu-se a tubos de ensaio e efetuou-se a reação de Borntraeger ao adicionar 5 mL de hidróxido de amônio e agitar lentamente. Para reação positiva observa-se o aparecimento de coloração vermelha.

4.4.1.1.7 Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos

Evaporou-se à secura 30 mL de cada fração, recuperou-se com 5 mL de clorofórmio e filtrou-se. Pipetou-se 0,1; 0,5 e 1 mL do extrato clorofórmico das quatro frações avaliadas para tubos de ensaio e completou-se o volume para 2 mL com clorofórmio.

Realizou-se a reação de Liberman-Bouchard adicionando-se 1 mL de anidrido acético e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, lentamente, em cada tubo de ensaio. A formação de coloração rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição três e duplo enlace na posição cinco e seis ou sete e oito. Coloração verde indica função hidroxila na posição três e duplo enlace em cinco e seis ou sete e oito. Coloração amarela, possível presença de metila no carbono número quatorze.

Para a reação de Keller Kelliani, separou-se 4 tubos de ensaio e transferiu-se 2 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólico, e então levados à secura. Os resíduos foram dissolvidos com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico a 1% e na sequência transferidos para um tubo de ensaio com 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Desenvolvimento de coloração na zona de contato dos líquidos, coloração azul ou verde na fase de contato dos dois líquidos e a coloração azul ou verde na fase acética, indica reação para desoxiaçúcares (azul – esteroides e verde - triterpenos).

4.4.2 Extrato aquoso

Preparou-se o extrato aquoso pelo processo de maceração a quente em banho-maria a 70 °C por uma hora, utilizando 40 g de material vegetal e 200 mL de água destilada. Após 1 hora, retirou-se o frasco do banho-maria, filtrou-se o extrato e completou-se o volume para 200 mL com o líquido extrator. Este extrato foi submetido aos testes para antocianinas, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogênicos, taninos, amino grupos, ácidos fixos e ácidos voláteis.

4.4.2.1 Pesquisa de metabólitos secundários no extrato aquoso

4.4.2.1.1 Pesquisa de antocianinas

Para realização deste ensaio, transferiu-se 5 mL do extrato aquoso para três tubos de ensaio, acidificou-se o primeiro tubo com HCl 1% (pH aproximadamente 4), alcalinizou-se o segundo tubo com hidróxido de amônio (pH aproximadamente 10) e neutralizou-se o terceiro tubo (pH 7). O desenvolvimento de coloração avermelhada em meio ácido, azulada em meio alcalino ou violácea em meio neutro, indica reação positiva.

Em outro ensaio, transferiu-se 10 mL do extrato aquoso e extraiu-se com álcool butílico saturado com água (duas vezes de 10 mL). As frações de álcool butílico foram reunidas em cápsula de porcelana e concentradas a aproximadamente 5 mL, adicionou-se 5 gotas de HCl concentrado e aqueceu-se a ebulição. No caso de reação positiva observa-se o desenvolvimento de coloração vermelha.

4.4.2.1.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Os tubos utilizados para a pesquisa de antocianinas foram agitados energeticamente, em movimentos succionais por um período de 5 minutos e deixou-se em repouso por 30 minutos. Mediu-se a altura do anel de espuma após a agitação e após o tempo de repouso, o desenvolvimento de espuma com altura superior a 1 cm e persistente após o repouso, indica a presença de heterosídeos saponínicos.

4.4.2.1.3 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos

Para este ensaio utilizou-se a reação do isopurpurato de sódio, transferiu-se para um tubo de ensaio 5 mL de extrato aquoso (cuidando-se para não umedecer as paredes do tubo de ensaio), adicionou-se 1 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 1N, suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico no tubo e o sistema foi mantido em banho-maria por trinta minutos à 60 °C. Reação positiva é observada com a formação de isopurpurato de sódio que apresenta coloração castanha a avermelhada.

4.4.2.1.4 Pesquisa de taninos

Primeiro, realizou-se o ensaio com cloreto férrico, aonde a 1 mL do extrato aquoso adicionou-se 5 gotas de solução aquosa a 1% de cloreto férrico. O desenvolvimento de coloração azul indica reação positiva para taninos, coloração verde positivo para flavonoides e coloração marrom indica a presença de polifenóis.

Na sequência, procedeu-se com o ensaio de Staniasny, transferiram-se 30 mL de extrato aquoso para um balão de fundo chato com 250 mL de capacidade e adicionou-se 6 mL de formaldeído 40% e 4 mL de ácido clorídrico 37%.

Acoplou-se o balão a um condensador de bolas e levou-se a refluxo durante uma hora. Decorrido o tempo, deixou-se esfriar e filtrou-se o extrato formol-clorídrico separando o filtrado para pesquisa de taninos hidrolisáveis. O resíduo da filtração lavou-se com uma solução de etanol 50% e gotejou-se sobre o resíduo solução aquosa de hidróxido de potássio 5%. Reação positiva para taninos condensados visualiza-se com desenvolvimento de coloração verde ao gotejar o hidróxido de potássio.

Ao filtrado, previamente reservado, adicionou-se excesso de acetato de sódio, sem agitação, e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Desenvolvimento de coloração azul indica reação positiva para taninos hidrolisáveis.

4.4.2.1.5 Pesquisa de amino grupos

Em um condensador de bolas a temperatura de 60 °C, concentrou-se 10 mL de extrato aquoso até 5 mL. Em tira de papel de filtro, adicionaram-se cinco gotas do extrato aquoso concentrado em pontos previamente demarcados. Após secagem, nebulizou-se o papel de filtro com solução de ninhidrina levando-o à estufa (95-100 °C) durante quinze minutos. Reação positiva é visualizada com o aparecimento de coloração azul-violácea.

4.4.2.1.6 Pesquisa de ácidos fixos

Transferiu-se para um balão de fundo redondo de 100 mL de capacidade 20 mL do extrato aquoso e 2 mL de NaOH 1 N. Levou-se ao refluxo por um período de 30 minutos em um condensador de bolas. Na sequência, a solução foi esfriada e acidificada com solução de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) 1 N e extraída três vezes de 10 mL com éter etílico.

Os extratos etéreos foram reunidos, tratados com carvão ativado, filtrados e levados à secura em banho-maria a 50 °C. Aqueceu-se o resíduo em estufa à 100 °C por dez minutos, esfriou-se, adicionou-se 5 mL de solução aquosa de hidróxido de amônio 1 N e filtrou-se. Adicionaram-se gotas do filtrado anterior a um papel de filtro, obtendo-se uma mancha com aproximadamente um centímetro de diâmetro. O primeiro ponto contém apenas o extrato amoniacal, o segundo o extrato amoniacal mais uma gota do reativo de Nessler e o terceiro ponto apenas o reativo de Nessler. Levou-se o papel de filtro à estufa por cinco minutos. Visualiza-se reação positiva com o aparecimento de coloração marrom no segundo ponto.

4.4.2.1.7 Pesquisa de ácidos voláteis

Para ácidos voláteis, transfere-se para um tubo de ensaio 5 mL de extrato aquoso, adiciona-se H_2SO_4 (ácido sulfúrico), suspende-se uma tira de papel tornassol e o sistema é mantido em banho-maria durante 30 minutos. Se o papel adquirir coloração avermelhada indica a presença de ácidos voláteis.

4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES

As folhas, secas e fragmentadas foram submetidas à maceração em aparelho de Soxhlet modificado com etanol 96%. (CARVALHO, 2001). Após a conclusão do processo de extração, concentrou-se o volume total obtido em evaporador rotativo com pressão reduzida a temperatura de 50 °C e 90 rpm, obtendo-se o extrato bruto, o qual foi armazenado em refrigerador.

Na sequência submeteu-se o extrato bruto, ao particionamento líquido-líquido em aparelho de Soxhlet modificado, com solventes de padrão analítico em escala crescente de polaridade, obtendo-se as frações hexânica (FH), clorofórmica (FCI), acetato de etila (FAC) e remanescente (FREM).

4.5.1 Determinação do teor de sólidos

Para a determinação de teor de sólidos depositou-se 10 mL de extrato bruto etanólico em placa de petri, levou-se a estufa 100 °C até peso constante e procedeu-se aos cálculos onde o resultado é apresentado em quantidade de sólidos em 10 mL e porcentagem em peso do teor de sólidos em relação ao material vegetal, conforme Farmacopeia Brasileira V edição (2010).

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE GRUPO DE CONSTITUINTE QUÍMICO

Após o processo de partição, da fração acetato de etila (2 g), realizou-se uma coluna cromatográfica com fase estacionária de sílica gel 60 Merck® (0,063 – 0,200mm) e como fase móvel uma mistura dos solventes acetato de etila e metanol, partindo-se de 50% de acetato até 100% de metanol. As misturas foram realizadas utilizando um volume de 100 mL, aumentando-se o gradiente de polaridade de 5 mL em 5 mL. No final desse processo, foram utilizados 300 mL de metanol para extrair compostos de maior polaridade. A pastilha a ser cromatografada foi preparada com sílica gel 60 na proporção de 5 partes em relação a quantidade de amostra. Obteve-se 138 frascos após a eluição da coluna e um frasco com o eluato da fase móvel 100% metanol, dos quais as frações de 82 a 138 apresentaram coloração amarela, o que pode ser indicativo de presença de flavonoides.

Para purificação as frações de 82 a 116, 117 a 138 e a 100% metanol foram unidas e concentradas até aproximadamente 5 mL e então eluidas, separadamente, em coluna de gel-filtração (Sephadex LH20), com a fase móvel 70% metanol e 30% água, obtendo-se 69 frascos. As amostras de 25 a 36, que apresentaram maior quantidade de material após processo de secagem em banho-maria foram submetidas à cromatografia de camada delgada (CCD) em placas cromatográficas com sílica-gel 60, sendo a aplicação da amostra realizada com capilares em forma de linha.

Utilizou-se como fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26) e como revelador reativo de NEU e visualização da placa sob luz UV 254 nm (WAGNER, 1996). As frações de 25 a 36 apresentaram banda de coloração amarela fluorescente sob luz UV, sendo, assim, positivo para flavonoides.

Da fração 35 pesou-se 10 mg de amostra e dissolveu-se em 10 mL de metanol grau HPLC. Injetou-se 20 µL da amostra em equipamento Merck® Elite Lachrom, software Chrom®, bomba L-2130, ultravioleta detectores DAD L2450 Elite LaChrom, coluna analítica XTerra RP18 dimensões (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) a 25 °C, com fluxo de 1 mL/min. O tempo de corrida foi de 45 minutos e o espectro de varredura utilizado de 200 a 400 nm.

Conforme, descrito no QUADRO 4, a eluição foi realizada em gradiente de concentração, sendo a fase A ácida (ácido fosfórico PA: ácido sulfúrico 0,1 N: água miliQ, na proporção 2: 200: 800 mL) e a fase B metanol.

QUADRO 4 – GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO EMPREGADO NAS ANÁLISES DE CLAE/DAD

Tempo (minutos)	FASE A: Fase ácida	FASE B: Metanol	Fluxo de injeção
0,0	80%	20%	1,0 mL/minuto
3,0	80%	20%	1,0 mL/minuto
35,0	0	100%	1,0 mL/minuto
40,0	0	100%	1,0 mL/minuto
43,0	80%	20%	1,0 mL/minuto

FONTE: O autor (2017).

4.7 TOXICIDADE PRELIMINAR

4.7.1 Toxicidade frente à *Artemia salina*

Procedeu-se o ensaio conforme metodologia citada por Meyer *et al.* (1982), com adaptações.

A solução salina foi preparada com 14,31 g de sal marinho em 400 mL de água destilada (35,7 mg/mL) e o pH foi ajustado na faixa entre 8-9 com carbonato de sódio, sendo este o pH ideal para a incubação das larvas. Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram mantidos em solução salina para eclosão por 48 h, sob aeração contínua e iluminação constante (20 W).

As amostras avaliadas foram o extrato bruto, fração hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente e o dodecil sulfato de sódio (SDS) como controle positivo, sendo estas (50 mg) diluídas em solução metanólica a 1% de Tween ® 80, obtendo-se uma solução mãe de 10 mg/mL. Desta transferiu-se volume o suficiente para frascos de vidro de capacidade de 10 mL, para obtenção das concentrações finais após ressuspensão de 10, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 ug/mL e também as concentrações de 20,30 e 40 ug/mL para o SDS. Após a transferência dos volumes, os mesmos foram secos em estufa á 37 °C. E então, ressuspendidos em solução salina a 1% de DMSO para 2 mL, obtendo-se as concentrações acima definidas. O mesmo procedimento realizou-se para o controle negativo, sem a adição de amostras testes, para avaliação frente aos solventes Tween 80 ® e DMSO. Realizou-se o ensaio em triplicata.

Após a eclosão dos ovos, transferiu-se 10 náuplios para cada vidro contendo 2 mL da solução salina a 1% de DMSO. Após 24 h, realizou-se a contagem dos náuplios vivos e mortos, sendo considerados aqueles que apresentaram qualquer movimento como vivos, utilizou-se como auxílio na contagem uma fonte luminosa.

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando o método PROBITOS no programa IBM SPSS Statistics 23, o qual forneceu os valores de CL_{50} (concentração letal para 50% dos indivíduos) com 95% de confiabilidade. Considerou-se amostras ativas as que CL_{50} foram menores que 1000 $\mu\text{g/mL}$, de acordo com Meyer et al. (1982).

4.7.2 Atividade hemolítica

O presente ensaio realizou-se conforme Aslam et al. (2011). Primeiro preparou-se o PBS consistindo de: NaCl 8,00 g, KCl 0,20 g, Na_2HPO_4 1,15 g e KH_2PO_4 0,20 g, completando-se o volume para 1000 mL e ajustando-se o pH para 7,4 com fosfato monopotássico, sendo a solução armazenada em refrigerador.

Na sequência transferiu-se 5 mL de sangue de carneiro de origem comercial da empresa Newprov®, previamente homogeneizado sob leve agitação manual, para um tubo de Falcon, previamente pesado, centrifugando-se a 3000 rpm por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 5 mL de PBS gelado e novamente centrifugou-se por 5 minutos a 3000 rpm. Foram realizadas 3 lavagens sequenciais com PBS descartando-se sempre o sobrenadante, até a obtenção de sobrenadante incolor; Em seguida, realizou-se uma diluição a 2,5% (p/v) com a papa de eritrócito utilizando-se como diluente o PBS gelado.

As soluções mãe das amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL, adicionando-se 1 mL de metanol em 10 mg de amostra, solubilizando-a em banho de ultrassom, completando-se o volume para 10 mL em balão volumétrico. A partir da solução mãe prepararam-se as seguintes diluições: 75, 100, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. As amostras avaliadas foram o extrato bruto, frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente. Utilizou-se saponina como padrão positivo (devido ao seu caráter hemolítico e por ser encontrado em produtos naturais). Uma solução aquosa de triton a 0,1% foi utilizada como padrão 100% hemolítico como controle positivo e o PBS como controle negativo.

Após o preparo das soluções e diluições, pipetou-se 20 µL de cada amostra, controle e padrão avaliados em eppendorfs de 2 mL e adicionou-se 180 µL da diluição de hemácias a 2,5% (p/v). Homogeneizaram-se as soluções com a pipeta cuidadosamente e os eppendorfs abertos foram incubados em estufa a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, os eppendorfs foram fechados e colocados em banho de gelo por 5 minutos, para interromper a reação de hemólise e em seguida centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos.

Na sequência, retirou-se 100 µL do sobrenadante e diluiu-se em 900 µL de PBS gelado, diluição realizada para que o controle positivo (triton), não ultrapasse a lei de Lambert-Beer na leitura do espectrofotômetro. Desta solução transferiu-se 200 µL para microplacas com fundo chato de 96 poços.

Procederam-se as leituras em espectrofotômetro de microplacas Multiscan FC, Thermo Scientific® a 576 nm e realizou-se a análise em triplicata. Para retirar a interferência do valor da placa, utilizou-se 20 µL do extrato, diluições e padrão mais 180 µL de PBS como branco.

A porcentagem de hemólise em relação ao controle foi calculada conforme equação abaixo:

$$\% \text{ hemólise} = ((\text{Abs}_A - \text{branco}) / (\text{Abs}_T - \text{branco})) * 100$$

Onde, Abs_A = Absorbância da amostra e Abs_T absorbância do triton.

4.8 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES

4.8.1 Redução do complexo fosfomolibdênio

Para a execução da avaliação da atividade antioxidante total pelo método da redução do complexo fosfomolibdênio, conforme Prieto *et al.* (1999), preparou-se o reativo que consiste de uma solução com fosfato de sódio 0,1 M (28 mL), molibdato de amônio 0,03 M (12 mL) e ácido sulfúrico 3 M (20 mL), em meio aquoso, sendo o volume completado com água destilada para 100 mL. Como padrões utilizaram-se o ácido ascórbico (vitamina C), a rutina e o hidroxitolueno butilado (BHT).

O extrato bruto, as frações hexano, clorofórmico, acetato de etila e remanescente e as soluções padrões foram preparados na concentração de 0,2 mg/mL em solução de metanol a 0,2% de DMSO. E o branco consistiu de metanol a 0,2% de DMSO.

Na sequência em tubos de ensaio, adicionou-se 3 mL do reativo e 0,3 mL de amostra, o mesmo foi feito para os padrões e o branco. Os tubos foram tampados e então mantidos em banho termostatizado a 95 °C por 90 minutos. Após o resfriamento retirou-se uma alíquota de 200 µl de cada amostra, branco e padrão e transferiu-se para uma microplaca de fundo chato de 96 poços e procedeu-se a leitura da absorbância a 695 nm em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific®). A presente análise foi realizada em triplicata.

A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em relação à vitamina C, rutina e BHT, considerando a absorbância dos padrões correspondente a 100% de atividade antioxidante, conforme a fórmula apresentada na sequência.

$$\text{AAR\% em RELAÇÃO AO PADRÃO} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (padrão)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

Para verificar diferença estatística entre as amostras aplicou-se à análise de variância (ANOVA), e para localização das diferenças o teste de Tukey, sendo estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4.8.2 Redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O potencial de redução do radical DPPH das amostras foi analisado conforme Mensor et al. (2001). Para este ensaio preparou-se as soluções estoques das amostras em metanol obtendo-se a concentração de 1 mg/mL e o DPPH dissolveu-se 3 mg em 25 mL de metanol.

Na primeira etapa realizou-se uma análise prévia da faixa de concentração em que cada extrato e padrões apresentavam atividade antioxidante. Avaliou-se o extrato bruto e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente e como padrões a vitamina C, rutina e BHT.

As seguintes faixas de concentração foram avaliadas: de 150 a 600 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato bruto, 150 a 700 $\mu\text{g/mL}$ para a fração hexano, 10 a 120 $\mu\text{g/mL}$ para o clorofórmio, 5 a 80 $\mu\text{g/mL}$ para o acetato de etila, 60 a 350 $\mu\text{g/mL}$ para a fração remanescente, 1,6 a 8 $\mu\text{g/mL}$ para a vitamina C, 2 a 18 $\mu\text{g/mL}$ para a rutina e de 1,6 a 10 $\mu\text{g/mL}$ para o padrão BHT.

Os ensaios foram realizados em microplacas com fundo redondo de 96 poços em formato de "U", nas quais se adicionou 142 μL das amostras e 58 μL da solução de DPPH. O controle negativo consistiu de 142 μL de metanol e 58 μL de DPPH e o branco de cada amostra foram de 142 μL da amostra e 58 μL de metanol.

Após trinta minutos de incubação no escuro procederam-se as leituras em fotômetro de microplacas Multiscan FC, Thermo Scientific® a 518 nm.

A capacidade em reduzir o radical das amostras foi calculada da seguinte forma, sendo o Abs corresponde ao valor da absorbância:

$$\% \text{ Inibição da oxidação do DPPH} = 100 - \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times 100}{\text{Abs controle}}$$

A partir das porcentagens de inibição de DPPH, por regressão linear calculou-se o IC₅₀, ou seja, a concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante. Os resultados de IC₅₀ foram comparados segundo método estatístico de Tukey (p<0,05).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

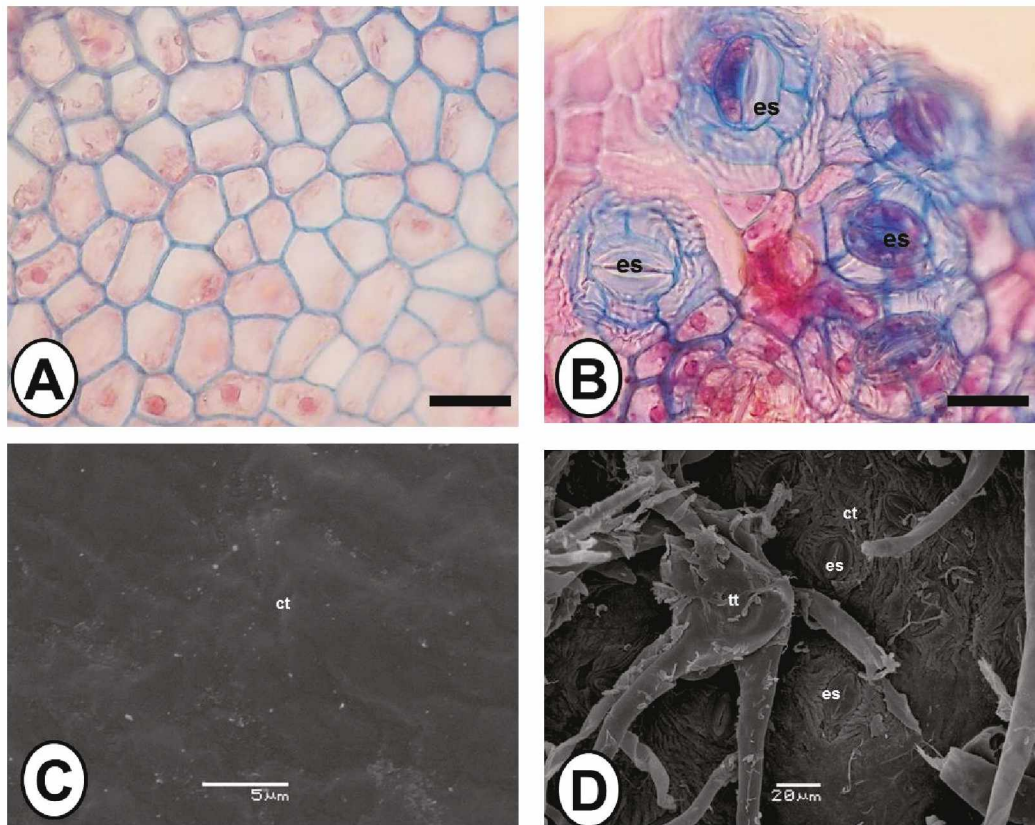
O material botânico após a coleta foi seco em temperatura ambiente por um período de 10 dias, após trituração do material vegetal obteve-se 736 g de folha da espécie *Oreopanax fulvus*.

5.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

As folhas de *Oreopanax fulvus* medem 15 a 30 cm, são cartáceas, glabras na face adaxial e tomentosas na face abaxial. São alternas, espiraladas, simples e de formato trilobado, essas características estão condizentes com as descritas por Pinto (2016).

Em vista frontal as células epidérmicas de *O. fulvus* apresentam-se delgada e retas em ambas as faces (FIGURA 5A E 5B). A folha é hipoestomática com estômatos anomocíticos (FIGURA 5B). Estômatos anomocíticos são comumente encontrados em Araliaceae. Entretanto, estômatos anisocíticos e braquiparacíticos também podem ser encontrados. (OSTROUMOVA; OSKOLSKI, 2010).

A cutícula evidenciada por microscopia eletrônica de varredura mostra-se lisa na face adaxial e estriada na face abaxial (FIGURA 5C E 5D).

FIGURA 5 - VISTA FRONTAL DA FOLHA DE *Oreopanax fulvus*.

FONTE: O autor (2017).

NOTA: A. Face adaxial. B. Face abaxial evidenciando estômatos. C. Cutícula da face adaxial evidenciada por MEV. D. Face abaxial em MEV. Barra 40 µm (A e B). es: estômato, ct: cutícula, tt: tricoma.

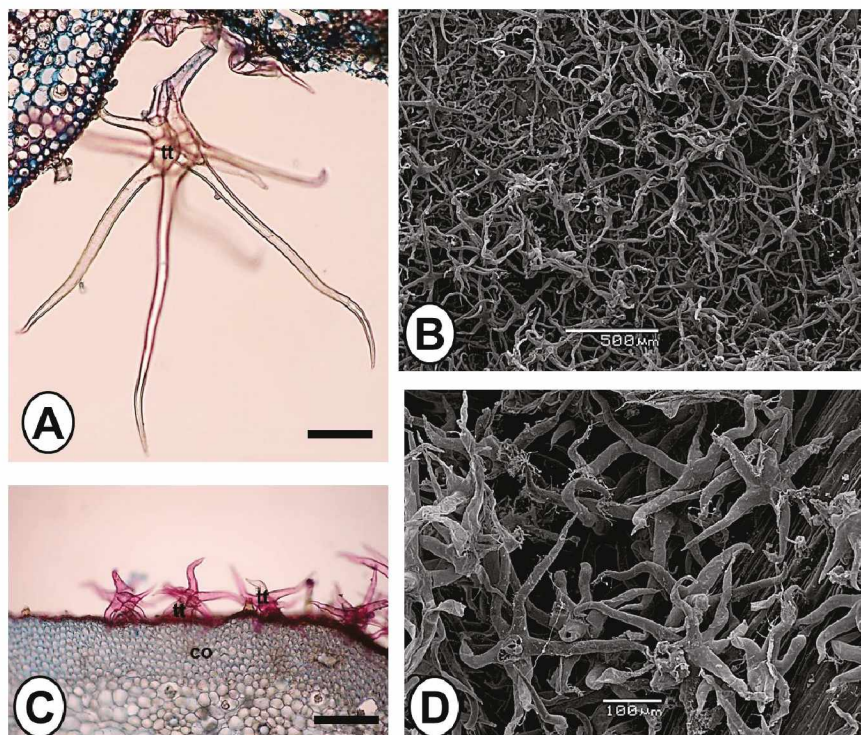
A espécie em estudo apresentou tricomas tectores ramificados na face abaxial. Sugere-se que possam ser classificados como tricomas estrelados em vista frontal (FIGURA 5D, FIGURA 6A-D). De um modo geral, entende-se por estrelado qualquer tricoma não glandular, pluricelular e ramificado (METCALFE E CHALK 1950; INANDAR E GANGANDHARA, 1977). Tricomas estrelados foram observados em outras espécies de Araliaceae como em *Brassaiopsis* Decne. & Planch., (SKVORTSOVA et al. 1994, WEN et al. 2003), *Tetrapanax* (K. Koch) K.Koch, *Astrotricha* DC., *Asian Schefflera* J.R.Forst. & G.Forst., (GRUSHVITZKY e SKVORTSOVA, 1969; BERNHARDT, 2001).

A denominação “tricoma” significa conjunto de pêlos (*trichos*, pêlo e *oma* massa ou conjunto). (GONÇALVES E LORENZI, 2007).

Os tricomas são anexos epidérmicos e podem ser uni ou multicelular. Geralmente, são estruturas formadas a partir de células epidérmicas se caracterizam por apresentar formas e funções bem variáveis, podendo ser utilizados para finalidades taxonômicas e também na morfodiagnose de drogas vegetais (METCALFE E CHALK, 1988; OLIVEIRA E AKISUE, 1997). Em um estudo realizado por Borchsenius (1997) em espécies do gênero *Oreopanax* do Equador foram observados tricomas do tipo lepidoto em *O. Bogotensis*.

Os tricomas tectores formam, geralmente, uma densa cobertura, como pode ser observado nas FIGURAS 6B e 6D, e podem atuar como barreira mecânica contra vários fatores externos como, ataque de herbívoros e patógenos, radiação ultravioleta, calor extremo e perda excessiva de água (VALKAMA et al., 2003). A presença de tricomas também está relacionada com a absorção e a eliminação de água, a percepção de estímulo, a proteção da planta através da redução da transpiração, da incidência da luz solar no aparato fotossintético e redução de calor. (HABERLANDT, 1990).

FIGURA 6 - TRICOMAS TECTORES DA FOLHA DE *Oreopanax fulvus*.



FONTE: O autor (2017).

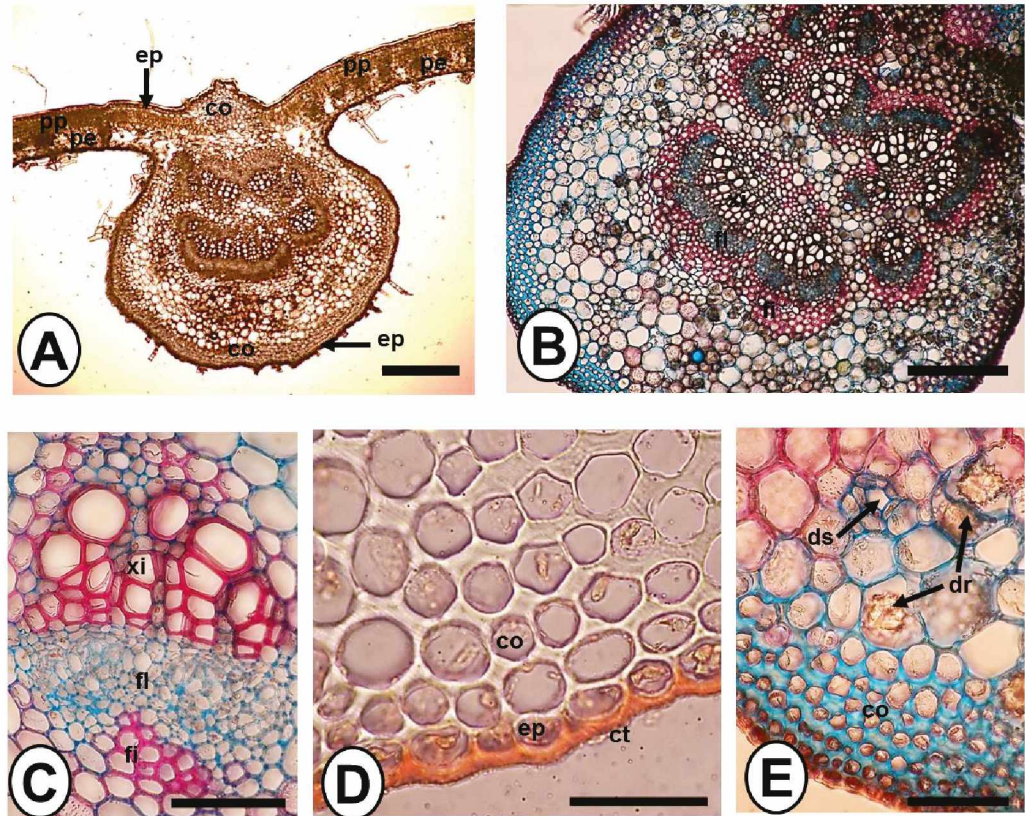
NOTA: A e C. Tricomas tectores ramificados em MO. B e D. Tricomas tectores ramificados presentes na face abaxial em MEV. Barra 100 µm (A e C). tt: tricoma tector, co: colênquima.

Em secção transversal, a epiderme de *O. fulvus* mostra-se uniestratificada com células isodiamétricas em ambas as faces (FIGURA 7A e 7E). Subjacente à epiderme encontra-se 3-4 camadas de colênquima lamelar em ambas as faces (7A, 7B, 7D e 7E). A epiderme é recoberta por cutícula que reage positivamente à reação com Sudam III, a qual identifica lipídeos (FIGURA 7D).

O mesofilo é formado por parênquima paliçádico, o qual possuiu uma especialização fotossintética, e de parênquima esponjoso. A disposição dos parênquimas e a presença de estômatos proporcionam as condições necessárias às trocas gasosas. (ESAU, 1976). Neste sentido, o mesofilo de *O. fulvus* apresentou-se dorsiventral sendo formado por dois estratos de parênquima paliçádico e 7-9 camadas de parênquima esponjoso (FIGURA 7A). Espaços intercelulares de tamanho variável ocorrem no parênquima esponjoso. Drusas de oxalato de cálcio ocorrem em células deste parênquima em *Eleutherococcus* (KANO, 1936), *Trevesia* Vis., *Dendropanax* Decne. & Planch., *Hedera*, *Gastonia* Comm. ex Lam., *Meryta*, *Neopanax*, *Pseudopanax*, *Cussonia* Thunb., *Schefflera chapana* (GRUSHVITZKY; SKVORTSOVA, 1969), *Schefflera emiliana*, *Delarbrea paradoxa* (OSTROUMOVA; OSKOLSKI, 2010). Feixes vasculares colaterais de pequeno porte também podem ser observados imersos no mesofilo.

A nervura central em secção transversal evidenciou formato biconvexo com maior proeminência na face abaxial (FIGURA 7A). Drusas de oxalato de cálcio e dutos secretores podem ser encontrados dispersos por todo o parênquima (FIGURAS 7B e 7E). Dutos secretores são observados em *Astrotricha*, *Neopanax* e *Pseudopanax* e podem ocorrer também no floema. (OSTROUMOV; OSKOLSKI, 2010).

O sistema vascular apresenta muitas variações em Araliaceae. Podem ocorrer feixes mais alongados como em *Eleutherococcus*, *Kalopanax*, *Hedera*, *Seemannaralia*, *Astrotricha*, *Panax ginseng* C.A. Mey. (GRUSHVITZKY et al., 1975). O sistema vascular de *Oreopanax fulvus* está representado por feixe vascular colateral com presença de células esclerenquimáticas adjacentes ao floema (FIGURAS 7B e 7C).

FIGURA 7 - SECÇÃO TRANSVERAL DA FOLHA DE *Oreopanax fulvum*.

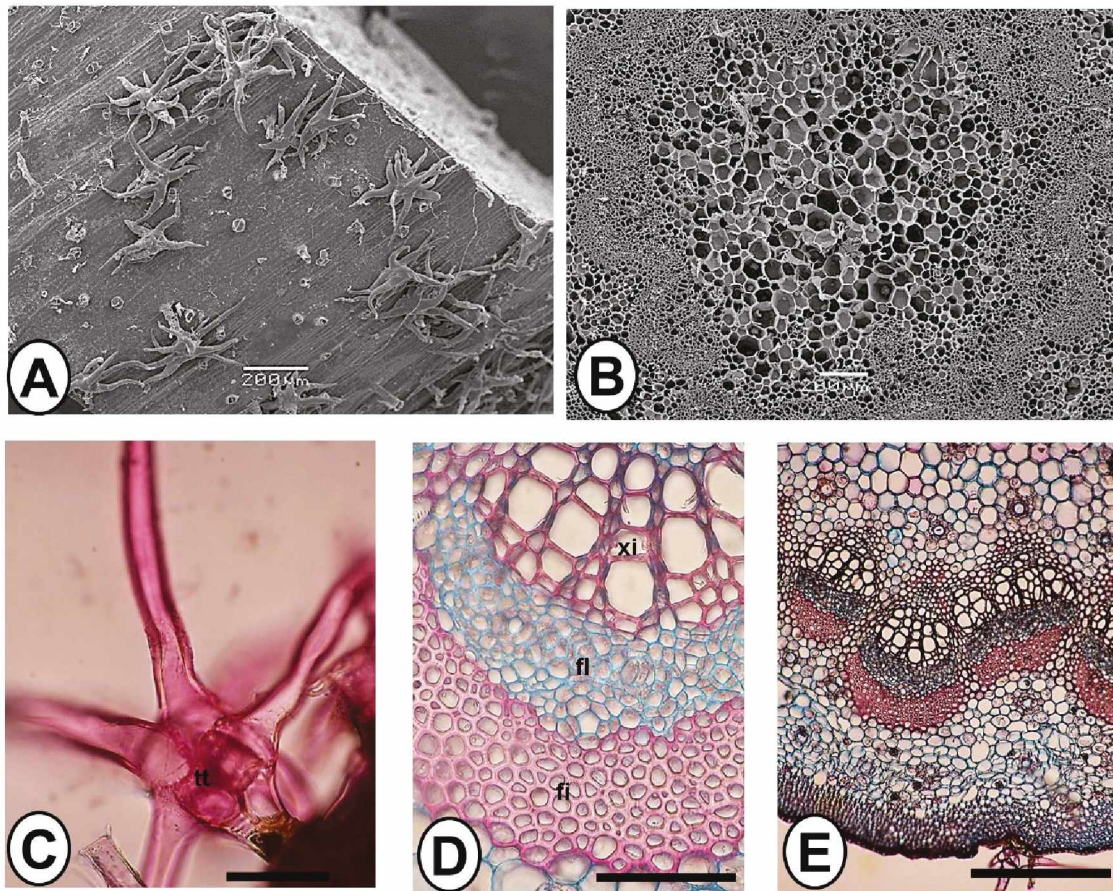
FONTE: O autor (2017).

NOTA: A. Visão geral da nervura central. B. Detalhes da nervura evidenciando a disposição dos feixes. C. Detalhes do feixe. D. cutícula em reação com sudam III. E. Detalhes do colênquima e parênquima mostrando drusas e duto secretor. Barra 50 µm (A) 100 µm (B) 200 µm (C, D e E). Ep: epiderme, ct: cutícula, co: colênquima, dr: drusas, ds, duto secretor, fi: fibras, fl: floema, pe: parênquima esponjoso, pp: parênquima paliçádico, xi: xilema.

O pecíolo de *Oreopanax fulvum* em secção transversal mostrou formato circular e tricomas tectores ramificados encontram-se dispersos pela epiderme (FIGURAS 8A e 8C).

Assim, como o descrito para a folha, o sistema vascular está representado por feixe vascular colateral com presença de células esclerenquimáticas adjacentes ao floema (FIGURAS 8B, 8D e 8E). Nota-se a presença de dutos secretores e drusas de oxalato de cálcio por toda a extensão (FIGURA 8E).

FIGURA 8 - SECÇÃO TRANSVERSAL DO PECÍOLO DE *Oreopanax fulvum*.



FONTE: O autor (2017).

NOTA: A. Epiderme em MEV. B. Disposição do sistema vascular em MEV. C. Detalhe do tricoma tector ramificado. D. Detalhe do feixe vascular. E. Disposição do feixe vascular em MO. Barra: 100 μm (E) 200μm (C e D).

5.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

5.3.1 UMIDADE E CINZAS

Na tabela 1 estão apresentados os valores de umidade e cinzas obtidos para folha de *Oreopanax fulvum*.

TABELA 1 – VALORES DE UMIDADE E CINZAS

UMIDADE E CINZAS	
Análise	Média/ Desvio padrão
Umidade	13,10±0,62
Cinzas	7,09±0,24

FONTE: O autor (2016).

As análises de umidade e cinzas são parâmetros que podem ser utilizados nos ensaios de pureza da planta. A análise de cinzas determina o teor de constituintes químicos ou impurezas orgânicas contidos na planta, não sendo estabelecido valor máximo de cinzas na farmacopeia brasileira. Já para a umidade, o valor foi de 13,10%, inferior ao limite máximo de 14% estabelecido (BRASIL, 2010), concluindo-se que o processo de secagem da planta foi eficaz. Visto que estes parâmetros ainda não haviam sido determinados para a espécie os valores determinados são referências iniciais para estas análises.

5.4 ENSAIO PRELIMINAR FITOQUÍMICO

Os resultados das análises qualitativas fitoquímicas a partir das frações do extrato hidroalcoólico estão apresentados na tabela 2.

TABELA 2 – PESQUISA PRELIMINAR FITOQUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA FOLHA

Análise		Fração hexano	Fração clorofórmio	Fração acetato de etila	Fração remanescente
Alcaloides	Reativo de Mayer	-	-	-	-
	Reativo de Dragendorff	-	-	-	-
	Reativo de Bouchardat	-	-	-	-
Flavonoides	Leucoantocianidinas	-	-	-	-
	Heterosídeo flavônico	-	-	+	-
				(cor rosa)	
	Reação de Taubock	-	-	-	-
	Reação de Pacheco	-	-	-	-
	Reação de zinco com HCl	-	-	-	-
Cumarina		-	-	-	-
Antraquinona		-	-	-	-
Iridoides	Ácido	-	-	-	-
	Ácido e vanilina	-	-	-	-
	Floroglucinol	+	-	-	-
Esteroides e/ou triterpenos	Liberman-Bouchard	+	-	-	-
		(cor verde)			
	Keller-Kelliani	+	-	-	-
		(cor verde)			

FONTE: O autor (2016).

NOTA: +=positivo/ -=negativo

Frente aos ensaios de alcaloides, cumarinas e antraquinonas os extratos avaliados apresentaram resultados negativos.

Observou-se resultado positivo para heterosídeos flavônicos da folha, com o desenvolvimento de coloração rosa para a fração acetato de etila. Os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos, pigmentos das plantas derivados da benzogamapirona. Estes compostos podem ocorrer como agliconas e glicosídeos (BEHLING et al., 2004).

A pesquisa de flavonoides baseia-se na modificação da estrutura dos flavonoides em presença de ácido. A posição da molécula de açúcar, o grau de insaturação do flavonoide, o grau e a natureza dos seus substituintes, são os fatores que vão influenciar na sua solubilidade e capacidade de precipitação na presença de metais. Na pesquisa de heterosídeos flavônicos utiliza-se HCl, o qual reduz o flavonol (amarelo) em antocianidina (vermelha). O aparecimento de derivados antociânicos (cor rosa) na fração de acetato de etila ocorre, pois estes compostos são poliois, tendo assim maior afinidade por solventes com maior polaridade (MIGUEL, 2003).

Na pesquisa de substâncias iridoidais, observou-se reação positiva na fração de hexano da folha. A presença destes compostos na fração hexano pode indicar que são iridoides não glicosídeos. Esses compostos na planta podem possuir a ação de defesa contra herbívoros e infecções de micro-organismos (MIGUEL, 2003).

Na pesquisa de esteroides e/ou triterpenos, detectou-se resultado positivo na reação de Libermann-Bouchard nas frações hexano da folha. Para a reação não se utiliza meio aquoso, pois há uma elevação rápida da temperatura e se tiver água no meio reacional, pode ocorrer explosão. É uma reação de ressonância, há a formação de SO_2 e a molécula final tem praticamente a mesma estrutura (ressonante + SO_2) que absorve no comprimento de onda de 650 nm (faixa do visível). Ressalta-se que a coloração verde observada também pode ser indicativa da presença de saponinas esteroides (MIGUEL, 2003).

Já para a reação de Keller-Kelliani observou-se resultado positivo para a fração hexano, com o desenvolvimento de cor verde, a qual indica a presença da classe de compostos triterpenos.

Os resultados das análises qualitativas fitoquímicas dos extratos aquosos estão apresentados na tabela 3.

TABELA 3 – PESQUISA PRELIMINAR FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA

Análise		Fração aquosa da folha
Heterosídeos antociânicos	Cloreto férrico Hidrolisáveis Condensados	-
Heterosídeos saponínicos		+
Heterosídeos cianogênicos		-
Taninos		+ (cor verde)
Ácidos voláteis		-
Ácidos fixos		-
Amino grupos		+

FONTE: O autor (2016).

NOTA: +=positivo/ -=negativo

Na pesquisa realizada com o extrato aquoso, os resultados para heterosídeos antociânicos, cianogênicos, ácidos voláteis e fixos foram negativos.

A pesquisa de saponinas foi positiva, estudos químicos e farmacológicos têm indicado que as saponinas triterpênicas são importantes bioativos da família Araliaceae. Saponinas isoladas e identificadas foram reportadas por terem atividades farmacológicas, incluindo, o aumento da eficiência mental e a estimulação do metabolismo. (TOMMASI et al., 1997). Na espécie *Oreopanax guatemalensis*, também foram identificadas saponinas triterpênicas. (MELEK et al, 2002).

O desenvolvimento de cor verde na pesquisa de cloreto férrico é indicativo de flavonoides, ressalta-se que também se observou resultado positivo para heterosídeos flavônicos no extrato etanólico da folha. A pesquisa de amino grupos pela reação com ninhidrina mostrou-se positiva. O reativo de ninhidrina detecta os compostos em cuja estrutura haja presença de nitrogênio, principalmente aminoácidos. (MIGUEL, 2003).

5.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

5.5.1 Obtenção do extrato bruto

Obteve-se o extrato bruto etanólico a partir das folhas da espécie *Oreopanax fulvum*. O rendimento do extrato e o teor de sólidos apresentam-se expressos na tabela 4.

O extrato bruto obtido foi utilizado para a obtenção das frações por partição líquido/líquido com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: hexano, clorofórmio e acetato de etila.

TABELA 4 – DETERMINAÇÕES REALIZADAS NO EXTRATO BRUTO DE *Oreopanax fulvum*

Parâmetro	Folha
Quantidade inicial de material vegetal (g)	736
Volume total após processo de extração (mL)	4400
Teor de sólidos (g%)	1,76
Quantidade de extrato bruto (g)	77,44
Rendimento do extrato bruto (%)	10,52

FONTE: O autor (2016).

5.5.2 Obtenção das frações

Realizou-se o particionamento líquido-líquido do extrato bruto da folha, iniciando-se a partição com 59,26 g do extrato, com a obtenção dos extratos hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólico (remanescente), as quais foram evaporadas em banho-maria a 70 °C. Os rendimentos das frações foram calculados em relação ao total do extrato bruto (5.5.1) e estão expostos na tabela 5.

TABELA 5 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA FOLHA DE *Oreopanax fulvus*

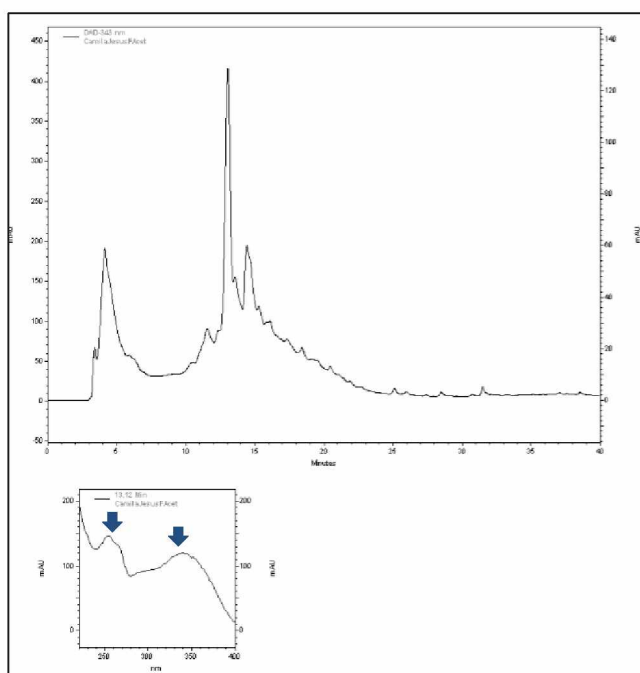
Material vegetal	Fração	Massa seca obtida (g)	Rendimento em relação à massa seca (%)
Folha	Hexano	35,35	59,66
	Clorofórmio	11,36	19,17
	Acetato de etila	3,62	6,11
	Remanescente	8,00	13,50

FONTE: O autor (2016).

5.6 IDENTIFICAÇÃO DE GRUPO DE CONSTITUINTE QUÍMICO

As frações de 25 a 36, oriundas da fração acetato de etila, foram submetidas à CCD e apresentaram banda de coloração amarela fluorescente sob luz UV, sendo, assim, positivo para flavonoides (WAGNER, 1996). A amostra 35 apresentou fator de retenção (R_f) igual a 0,61, sendo referente à distância percorrida pela amostra dividida pela distância percorrida pela fase móvel. O cromatograma obtido da fração 35 está apresentado na figura 9.

FIGURA 9 – CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO 35 DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *Oreopanax fulvus*.



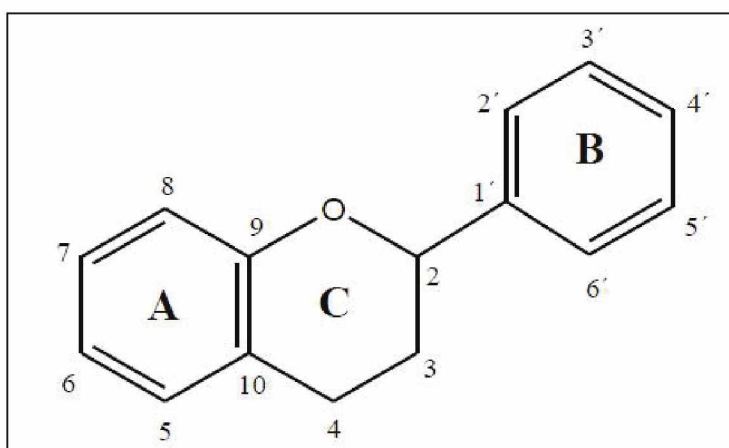
FONTE: O autor (2017).

Conforme se observa na figura 9, o pico principal da fração 35 está em 13,12 minutos. Esse pico apresentou bandas em 340 e 254 nm, similar aos padrões de UV de substâncias do tipo flavonoide, possuindo duas bandas de absorção máxima, sendo uma relacionada com os anéis B e C em 300 a 380 nm e a segunda entre 230 a 280 nm, relacionadas ao anel A (FIGURA 10).

Os espectros dessa classe variam conforme a oxigenação do composto, provocando desvios das bandas de absorção (MABRY *et al.*, 1970).

Diante disto, confirma-se a presença de substâncias da classe flavonoide na fração acetato de etila da folha de *Oreopanax fulvum*.

FIGURA 10 – ESTRUTURA BÁSICA DO FLAVONOIDE.



FONTE: MABRY *et al.* (1970)

5.7 TOXICIDADE PRELIMINAR

5.7.1 Avaliação da toxicidade aguda frente à *Artemia salina*

Os resultados da avaliação da toxicidade preliminar frente à *Artemia salina* estão representados na tabela seguinte.

TABELA 6 – RESULTADOS DA TOXIDADE AGUDA FRENTE À *Artemia salina*

Atividade da toxicidade aguda frente à <i>Artemia salina</i>		
Fração	CL ₅₀ (µg/ml ⁻¹)	Intervalo de confiança de 95% (µg/mL ⁻¹)
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	22,299	12,205-31,197
Extrato bruto	≥1000	-
Hexano	≥1000	-
Clorofórmio	≥1000	-
Acetato de etila	≥1000	-
Remanescente	≥1000	-

FONTE: O autor (2017).

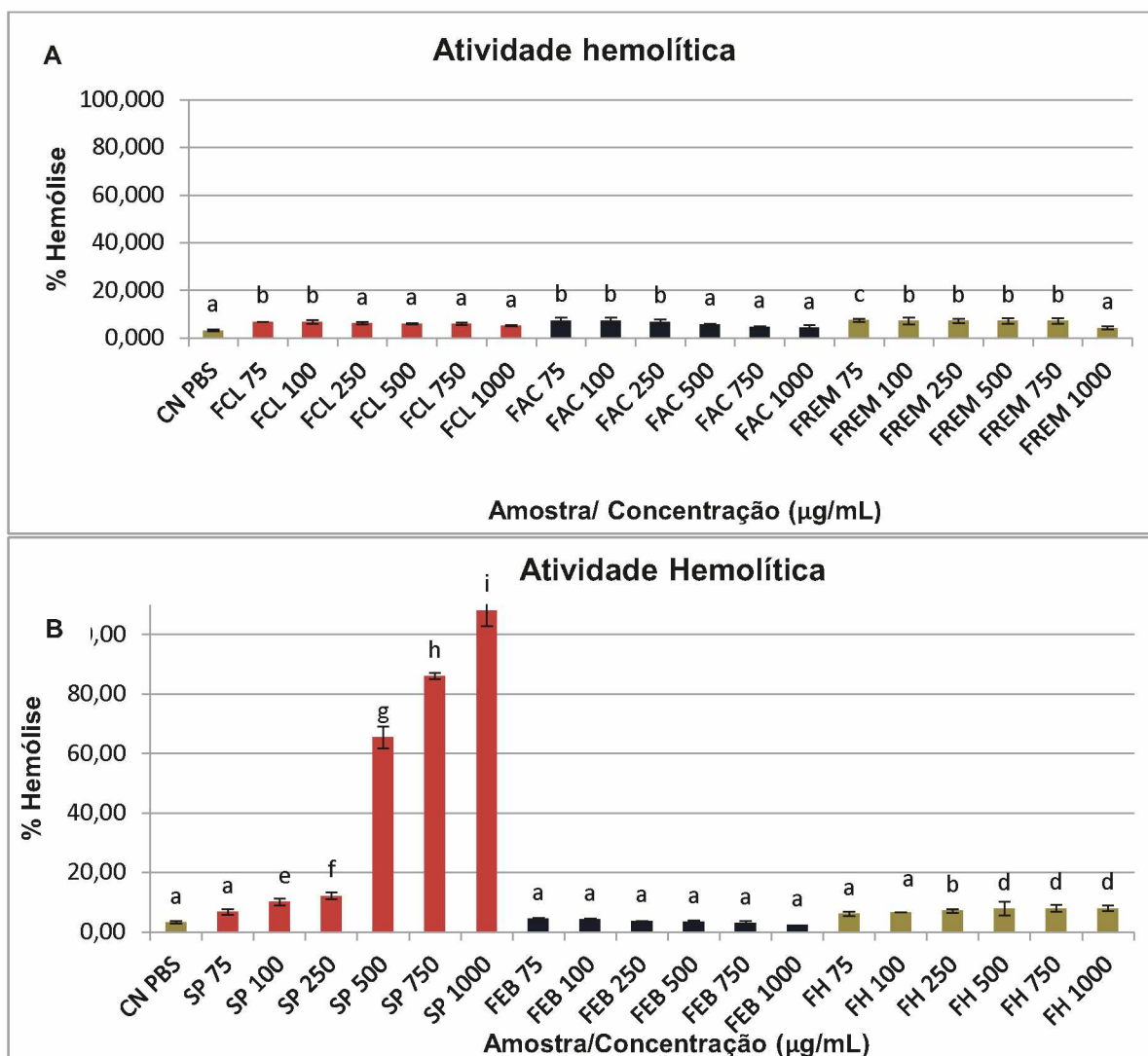
O extrato bruto e as frações avaliadas não apresentaram toxicidade frente à *Artemia salina*, visto que a dose letal (CL₅₀) foi superior a 1000 µg/mL⁻¹, conforme Meyer *et al.* (1982). O controle positivo da análise consistiu do SDS, o qual apresentou a CL₅₀ de 22,3 µg/mL⁻¹, esta dentro da faixa definida por Veiga *et al.* (2002) que é de 13,1 a 30,9 µg/mL⁻¹, concluindo-se que a sensibilidade dos microcrustáceos avaliados estava padronizada. O fato que corrobora com o resultado deste ensaio é que a espécie apresenta frutos os quais são consumidos por pássaros. (CARVALHO, 2014).

Outras plantas da família Araliaceae também tiveram a toxicidade avaliada perante *Artemia salina*, a *Hedera nepalensis* apresentou 50% de mortalidade para o extrato bruto, 40% para a fração hexano e clorofórmio e de 30% para a fração acetato de etila na concentração de 1000 µg/mL⁻¹ (AHMAD *et al.*, 2012). *Schefflera leucantha* apresentou CL₅₀ do extrato bruto superior a ≥ 1000 µg/mL⁻¹. (POTDUANG *et al.*, 2007).

5.7.2 Atividade hemolítica

Este ensaio define se os extratos causam lise aos eritrócitos. Na sequência estão apresentados os gráficos, onde se pode visualizar a porcentagem de hemólise obtida para a saponina, extrato bruto e fração hexano na parte A e da fração clorofórmio, acetato de etila e remanescente na parte B.

GRÁFICO 1 – RESULTADOS DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA.



FONTE: O autor (2017).

NOTA: CN=Controle negativo, SP= saponina, FEB=extrato bruto FH=fração hexano, FCL=clorofórmio, FAC=fração acetato de etila, FREM=fração remanescente. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística em nível de 5% de significância, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística em nível de 5% de significância.

Observa-se que a saponina apresentou atividade hemolítica dose dependente, sendo esta significativa a partir da concentração de 100 µg/mL na qual se obteve 10% de hemólise e alcançando 108% de hemólise na concentração de 1000 µg/mL. A concentração inicial de 75 µg/mL apresentou hemólise de 6%, sendo estatisticamente semelhante ao controle negativo PBS.

O extrato bruto em todas as concentrações avaliadas não apresentou hemólise quando comparado ao controle negativo PBS e ao controle positivo saponina, visto que os valores obtidos de 2,3% a 4,4% são estatisticamente iguais ao controle negativo e inferiores ao da saponina, conforme pode ser observado no gráfico 1 e tabela 7.

A fração hexano foi considerada hemolítica a partir da concentração de 250 µg/mL (7,03%) atingindo o maior valor na concentração de 1000 µg/mL (7,95%), visto tais valores serem estatisticamente distintos do controle negativo PBS, conforme gráfico 1 e tabela 7. Esta fração apresenta baixa polaridade, assim, a mesma apresentará menor concentração de compostos polares, como heterosídeos flavônicos, do que as frações mais polares. (AZEVEDO et al., 2014). Diante disto, o aumento do valor de hemólise com o aumento da concentração da fração hexano, pode estar correlacionado ao fato de que com a redução da polaridade da amostra teste, ou seja, aumento da concentração da fração há diminuição de compostos com maior polaridade como flavonoides, os quais podem apresentar potencial antioxidante e consequentemente proteger a célula da hemólise. (SHABBIR et al., 2013; AZEVEDO et al., 2014).

Para as frações clorofórmio, acetato de etila e remanescente observa-se que o valor de hemólise obtido diminui conforme se aumenta a concentração da fração. As frações avaliadas no gráfico 1B apresentam maior polaridade do que a fração hexano. Conforme observado na pesquisa preliminar fitoquímica, as frações mais polares, acetato de etila e aquosa, foram positivas para heterosídeos flavônicos e na fração acetato de etila detectou-se na análise por meio de CLAE a presença de bandas de absorção máxima similares aos padrões de UV de substâncias tipo flavonoides. (MABRY et al., 1970).

Os flavonoides são compostos antioxidantes que podem proteger a células de danos. (BIANCHI et al., 1999; SHABBIR et al., 2013). Assim, com o aumento das concentrações destas frações há um aumento nas concentrações destas substâncias e, conseqüentemente, aumenta a inibição da peroxidação lipídica da célula e diminuição dos danos oxidativo no eritrócito. (SHABBIR et al., 2013).

O extrato e frações avaliadas pelo presente método não apresentaram hemólise, quando comparado ao padrão saponina e o controle PBS, pois os valores foram iguais estatisticamente ao controle negativo PBS ou inferiores a atividade hemolítica da saponina, observada a partir da concentração de 100 µg/mL.

Na família Araliaceae, a espécie *Hedera helix* é conhecida por apresentar atividade hemolítica devido à presença das saponinas triterpênicas α-hederina, β-hederina e hederagenina. (HARBORNE et al., 1999; POLYA, 2003).

Para a espécie em estudo, *O. fulvus*, na pesquisa preliminar fitoquímica a fração aquosa foi positiva para saponinas, entretanto, não observou-se hemólise quando comparados ao padrão positivo e controle negativo utilizados na presente análise, o que pode estar associado a baixa concentração de saponinas na espécie e a não presença de substâncias tóxicas, visto a toxicidade preliminar frente à *Artemia salina* para todas as amostras avaliadas as CL₅₀ serem ≥ 1000 µg/mL, ou seja, não apresentaram toxicidade.

Na tabela 7, estão apresentados os valores de hemólise, desvio padrão relativo e classificação de Tukey de todas as amostras avaliadas.

TABELA 7- RESULTADOS DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Amostra (µg/mL)	Hemólise (%)	Amostra (µg/mL)	Hemólise (%)
CN PBS	3,211±0,46 ^a	FCL 75	6,881±0,00 ^b
		FCL 100	6,881±0,80 ^b
SP 75	6,728±0,96 ^a	FCL 250	6,269±0,53 ^a
SP 100	10,092±1,21 ^e	FCL 500	6,116±0,27 ^a
SP 250	12,080±1,15 ^f	FCL 750	5,963±0,46 ^a
SP 500	65,443±3,71 ^g	FCL 1000	5,199±0,27 ^a
SP 750	85,988±1,02 ^h		
SP 1000	108,104±5,32 ⁱ	FAC 75	7,339±1,21 ^b
		FAC 100	7,339±1,21 ^b
FEB 75	4,434±0,27 ^a	FAC 250	6,881±0,92 ^b
FEB 100	4,281±0,27 ^a	FAC 500	5,810±0,27 ^a
FEB 250	3,670±0,00 ^a	FAC 750	4,740±0,27 ^a
FEB 500	3,364±0,53 ^a	FAC 1000	4,434±1,06 ^a
FEB 750	2,905±0,70 ^a		
FEB 1000	2,294±0,00 ^a	FREM 75	7,492±0,70 ^c
		FREM 100	7,187±1,32 ^b
FH 75	6,116±0,70 ^a	FREM 250	7,187±0,96 ^b
FH 100	6,637±0,00 ^a	FREM 500	7,227±1,12 ^b
FH 250	7,034±0,70 ^b	FREM 750	7,187±1,15 ^b
FH 500	7,817±2,27 ^d	FREM 1000	4,281±0,70 ^a
FH 750	7,951±1,15 ^d		
FH 1000	7,951±0,96 ^d		

FONTE: O autor (2017).

Nota: CN=controle negativo, SP= saponina, FEB=extrato bruto, FH=fração hexano, FCL= fração clorofórmio, FAC=fração acetato de etila, FREM=fração remanescente. Dados expressos em média aritmética ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística em nível de 5% de significância, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística em nível de 5% de significância.

5.8 ATIVIDADES ANTIOXIDANTES

5.8.1 Redução do complexo fosfomolibdênio

O complexo fosfomolibdênio, inicialmente de cor amarela (molibdênio VI), em contato com amostras que apresentam atividade antioxidante torna-se de coloração verde (molibdênio V) à medida que se reduz e ocorre a complexação entre molibdênio V e fosfato. Assim, este ensaio determina a inibição do molibdato de amônio pela ação dos extratos avaliados. (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

As atividades antioxidantes determinadas com a presente análise estão apresentadas na tabela seguinte.

TABELA 8 – RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO DO FOSFOMOLIBDÊNIO

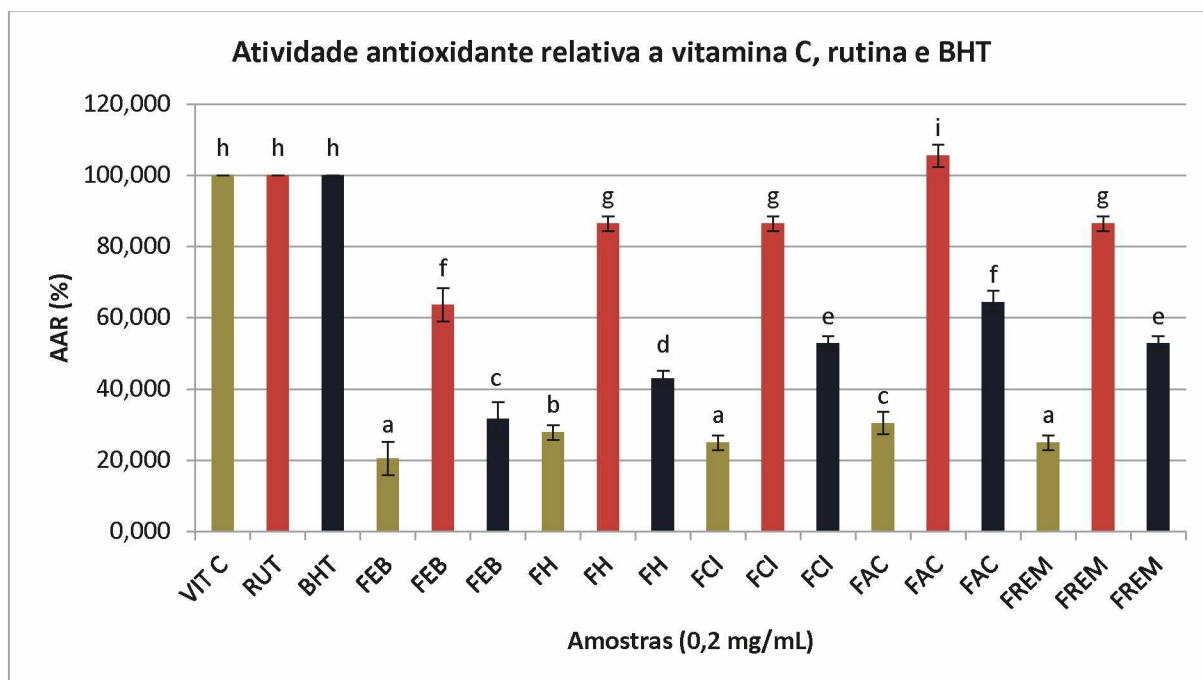
Atividade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio			
Fração	Atividade Antioxidante em relação à Vitamina C (%)	Atividade Antioxidante em relação à Rutina (%)	Atividade Antioxidante em relação ao BHT (%)
Vitamina C	100 ^h	-	-
Rutina	-	100 ^h	-
BHT	-	-	100 ^h
Extrato bruto	20,496±4,62 ^a	63,651±4,62 ^f	31,667±4,62 ^c
Hexano	27,831±2,09 ^b	86,432±2,09 ^g	43,000±2,09 ^d
Clorofórmio	24,987±2,04 ^a	86,447±2,04 ^g	52,796±2,04 ^e
Acetato de etila	30,492±3,17 ^c	105,495±3,16 ⁱ	64,430±3,16 ^f
Remanescente	24,987±2,04 ^a	86,447±2,04 ^g	52,796±2,04 ^e

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Dados expressos em média aritmética ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística em nível de 5% de significância, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística em nível de 5% de significância.

Para melhor comparação dos resultados obtidos os mesmos foram plotados no gráfico 2.

GRÁFICO 2 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO COMPLEXO DO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS RELATIVAS À VITAMINA C, RUTINA E BHT.



FONTE: O autor (2017).

NOTA: VIT C=Vitamina C, RUT=Rutina, BHT=Butilhidroxitolueno, FEB=extrato bruto, FH=fração hexânica, FCI= fração clorofórmio, FAC=fração acetato de etila, FREM=fração remanescente. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística em nível de 5% de significância, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística em nível de 5% de significância.

A atividade antioxidante em relação à vitamina C e BHT foram menores e apresentaram maior diferença estatística em relação a estes padrões do que em relação ao padrão rutina, entretanto, ressalta-se que a rutina por ser um composto originário de plantas é um melhor comparativo para a AAR% dos extratos avaliados.

Em relação à rutina todas as frações apresentaram considerável atividade antioxidante, sendo que a FH (86,432%), FCI (86,477%) e FREM (86,477%) apresentaram resultados próximos estatisticamente e a fração FAC maior que o da rutina (105,495%), ou seja, a fração que apresentou maior potencial antioxidante.

Ainda, quando se compara as atividades antioxidantes em relação aos padrões vitamina C e BHT, dentre todas as frações a que apresentou maior atividade foi a FAC. Este fato pode estar relacionado com a presença de flavonoides, visto que, a pesquisa preliminar fitoquímica apresentou resultado positivo para tais substâncias. Aliado a isto, a análise por CLAE detectou-se a presença de bandas de absorção máxima similares aos padrões de UV de substâncias tipo flavonoides, os quais são antioxidantes naturais. (MABRY *et al.*, 1970).

5.8.2 Redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A molécula do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical livre estável, devido ao deslocamento de elétron desemparelhado através da molécula e isto também fornece a molécula uma coloração violeta, com banda de absorção em 518 nm. Quando a solução de DPPH é colocada em contato com uma substância que pode doar um hidrogênio a molécula, o DPPH passa para a sua forma reduzida, o difenil-picrilhidrazina, passando da coloração violeta para a amarelada, com redução da absorbância. (MOLYNEUX, 2004).

No presente ensaio avaliou-se a capacidade das amostras a reduzir 50% da atividade antioxidante do DPPH, por meio da regressão linear.

Os gráficos que apresentam a curva de calibração utilizada para a determinação da IC₅₀ das amostras testadas e dos padrões utilizados estão expostos no (ANEXO 2). A partir das curvas de calibrações obtidas determinaram-se as concentrações das amostras e padrões capazes de reduzir 50% do DPPH presente no meio reacional, sendo estes resultados apresentados na tabela 9 e gráfico 3.

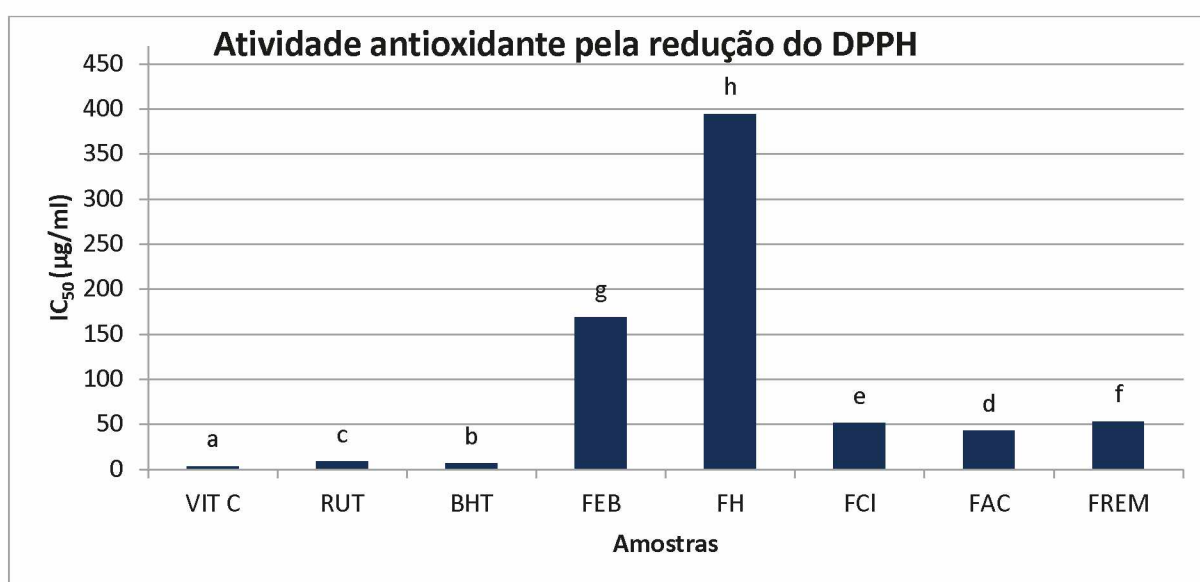
TABELA 9 – RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

Atividade antioxidante pela redução do radical DPPH	
Fração	IC ₅₀ (µg/ml)
Vitamina C	3,555 ^a
Rutina	8,646 ^c
BHT	6,741 ^b
Extrato bruto	168,934 ^g
Hexano	394,405 ^h
Clorofórmio	51,219 ^e
Acetato de etila	42,900 ^d
Remanescente	53,096 ^f

FONTE: O autor (2017).

NOTA: Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística em nível de 5% de significância, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística em nível de 5% de significância.

GRÁFICO 3 - RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH E CLASSIFICAÇÃO TESTE DE TUKEY.



FONTE: O autor (2017).

NOTA: VIT C=Vitamina C, RUT= Rutina, BHT= Hidroxitolueno butilado, FEB=extrato bruto, FH=fração hexânica, FCI= fração clorofórmio, FAC=fração acetato de etila, FREM=fração remanescente. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatística em nível de 5% de significância, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística em nível de 5% de significância.

O extrato bruto e fração hexano foram às amostras que mais se distanciaram estatisticamente dos padrões, apresentando IC₅₀ de 168,934 µg/mL e 394,405 µg/mL, conforme se observa no gráfico 3.

As frações clorofórmio, acetato de etila e remanescente apresentaram resultados próximos estatisticamente, sendo que conforme o também observado para a redução do complexo fosfomolibdênio a fração acetato de etila apresentou o maior potencial antioxidante IC_{50} de 42,900 $\mu\text{g/mL}$, o que pode estar correlacionado a presença de flavonoides nesta fração. Os flavonóides atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres, pois apresentam a capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto, inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres. (BIANCHI et al., 1999).

Outras espécies da família tiveram a atividade antioxidante avaliada pelo método de DPPH. O extrato bruto da folha de *Schefflera leucanta* apresentou IC_{50} de 71,90 $\mu\text{g/mL}$ (POTDUANG et al., 2007), sendo esta atividade superior ao observado para o extrato bruto da folha de *Oreopanax fulvum* (168,934 $\mu\text{g/mL}$). A *Schefflera venulosa* apresentou IC_{50} de 126,60 $\mu\text{g/mL}$ para a fração acetato de etila e de 15,16 $\mu\text{g/mL}$ para a fração aquosa, visto a pesquisa preliminar das folhas dessa espécie dar positivo para flavonoides na fração aquosa e não na fração acetato de etila, sendo o mesmo observado para a espécie *Schefflera wallichiana*. (DEEPA et al., 2013).

6 CONCLUSÃO

O estudo das folhas de *Oreopanax fulvum* trata-se do primeiro estudo fitoquímico e biológico da espécie. A descrição morfoanatômica fornece informações para a correta identificação e caracterização da espécie em estudo e as análises de umidade e cinzas forneceram parâmetros que podem ser utilizados nos ensaios de pureza da planta.

Na pesquisa preliminar fitoquímica a fração acetato de etila foi positiva para flavonoides, a fração hexano positiva para esteroides e triterpenos e a fração aquosa positiva para saponinas, flavonoides e amino grupos. Também na fração acetato de etila por meio de análise por CLAE detectou-se a presença de substâncias do tipo flavonoides, mas ainda são necessários mais estudos e experimentos para isolamento e identificação destas substâncias.

O extrato bruto e as frações avaliadas não apresentaram toxicidade frente à *Artemia salina*, visto que a dose letal (CL_{50}) foi superior a $1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$. Na avaliação da atividade hemolítica o extrato e frações avaliadas não apresentaram hemólise, quando comparado ao padrão saponina e o controle PBS, pois os valores foram iguais estatisticamente ao controle negativo PBS ou inferiores a atividade hemolítica da saponina, observada a partir da concentração de $100 \mu\text{g/mL}$.

Na avaliação da atividade antioxidante a fração acetato de etila apresentou o maior potencial antioxidante, o que pode estar correlacionado a presença de flavonoides nesta fração.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, M. D.; SILVA, A. C.; HIGUCHI, P.; NEGRINI, M.; NETO, J. F. Potencial de uso de espécies arbóreas de uma floresta secundária em Lages, Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 11, n.3, p. 238-247, 2012.

AGUIAR, C. **Botânica: Para Ciências Agrárias e do Ambiente**. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, 2013.

AHMAD, B.; MUNIR, N.; BASHIR, S.; AZAM, S.; KHAN, I.; AYUB, M. Biological screening of *Hedera nepalensis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n.39, p. 5250-5257, 2012.

ASLAM, F.; RIAZ, M.; ZUBAIR, M.; RIZWAN, K.; BUKHARI, T. H.; BUKHARI, . H. Antioxidant, haemolytic activities and GC-MS profiling of *Carissa carandas* roots. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. 4, p. 567-578, 2012.

ASSINEWE, V. A.; BAUM, B. R.; GAGNON, D.; ARNASON, J. T. Phytochemistry of Wild Populations of *Panax quinquefolius* L. (North American Ginseng). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 51, p. 4549-4553, 2003.

AZEVEDO, L. F. P.; FARIA, T. S. A.; PESSANHA, F. F.; ARAUJO, M. F.; LEMOS, G. C. S. Triagem fitoquímica e atividade antioxidante *Costus spicatus*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, 2014.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. v. 1, 305p.

BEDIR, E.; KIRMIZIPEKMEZ, H.; STICHER, O.; CALIS, I. Triterpene saponins from the fruits of *Hedera helix*. **Phytochemistry**, n. 53, p. 905-909, 2000.

BEDIR, E.; TOYANG, N. J.; KHAN, I. A.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. A New Dammarane-Type Triterpene Glycoside from *Polyscias fulva*. **Journal of Natural Products**, n. 64, p. 95-97, 2001.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonoide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 13, p. 285-292, 2004.

BERNHARDT, M. **Vergleichende Untersuchungen zur Blattanatomie und -morphologie andewählter Araliaceae**. Marburg: Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg, 2001.

BERLYN, G. P.; MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa State University, Ames, 1976.

BERNART, M. W.; CARDELLINA, J. H.; BALASCHAK, M. S.; ALEXANDER, M. R.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Cytotoxic Falcarinol Oxylipins from *Dendropanax arboreus*. **Journal of Natural Products**, n. 59, p. 748-753, 1996.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, n. 12, v. 2, p. 123-130, 1999.

BORCHESSENIUS, F. *Oreopanax* (Araliaceae) in Equador. **Nordic Journal of Botany**, n. 17, v. 4, p. 373-396, 1997.

BREEMEN, R. B. V.; CHUANG, C. R.; LU, Z. Z.; RIMANDO, A.; FONG, H. H. S.; FITZLOFF, J. F. Electrospray Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry of Ginsenosides. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 21, 1995.

BRITO, C. J. F. A.; ALQUINI, Y. A new method for staining botanical material embedded in glycol methacrylate (GMA). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 4, p. 949-951, 1996.

CAPUTO, L. F. F.; GITINARA, L. de B.; MANSO, P. P. de A. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, v. 2 p. 123-130. 2011.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R BR BRASSICACEAE**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa, 2014.

CHENG, S. Y.; WANG, C. M.; HSU, Y. M.; HUANG, T. J.; CHOU, S. C.; LIN, E. H.; CHU, C. H. Oleanane-Type Triterpenoids from the Leaves and Twigs of *Fatsia polycarpa*. **Journal of Natural Products**, n. 74, p. 1744-1750, 2011.

CHO, S. O.; BAN, J. Y.; KIM, J. H.; JU, H. S.; LEE, I. S.; SONG, K. S.; BAE, K.; SEONG, Y. H. Anti-ischemic Activities of *Aralia cordata* and Its Active Component, Oleanolic Acid. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 6, p. 923-932, 2009.

CIOFFI, G.; BELLINO, A.; PIZZA, C.; VENTURELLA, F.; TOMMASI, N. Triterpene Saponins from *Tupidanthus calyptratus*. **Journal of Natural Products**, n. 64, p. 750-753, 2001.

CIOFFI, G.; PIAZ, F. D.; VASSALLO, A.; VENTURELLA, F.; CAPRARIS, P.; SIMONE, F.; TOMMASI, N. Antiproliferative Oleanane Saponins from *Meryta denhamii*. **Journal of Natural Products**, n. 71, p. 1000-1004, 2008.

CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY (CBD). Disponível em: <<http://www.cbd.int/convention/text/>>. Acesso em: 17 abril 2016.

CHRISTENSEN, L. P.; LAM, J.; THOMSEN, T. Polyacetylenes from the fruits of *Hedera helix*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 4151-4152, 1991.

DEEPA, H. R.; NALINI, M. S. Phytochemical screening, total phenolic content and in vitro antioxidant studies of leaf, bark and flower extracts of *Schefflera spp.* (Araliaceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 11, p. 94-98, 2013.

EGUALE, T.; TILAHUN, G.; DEBELLA, A.; FELEKE, A.; MAKONNEN, E. *Haemonchus contortus*: *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Hedera helix*. **Experimental Parasitology**, n. 116, p. 340-345, 2007.

ELIAS, R.; LANZA, A. M. D.; OLLIVIER, E. V.; BALANSARD, G. Triterpenoid saponins from the Leaves of *Hedera helix*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 1, p. 98-103, 1991.

ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. 3 ed. New York: John Willey and Sons, 1976.

FAKIM, A. G. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, n. 27, p. 1-93, 2006.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.

FUJIMOTO, Y.; WANG, H.; SATOH, M.; TAKEUCHI, N. Polyacetylenes from *Panax quinquefolium*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 5, p. 1255-1257, 1994.

FUCHS, C.H. Fuchsin staining with NaOH clearing for lignified elements elements of whole plants or plants organs. **Stain Technology**, v. 38, p. 141-144, 1963.

GONÇALVES, E. G.; LORENZI, H. **Morfologia vegetal: organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares**. Nova Odessa: Plantarum, 2007.

GRINGS, M.; BRACK, P. Árvores na vegetação nativa de Nova Petrópolis, Rio Grande do Sul. **Iheringia**, v. 64, n. 1, p. 5-22, 2009.

GRUSHVITZKY, I. V; SKVORTSOVA, N. T. A new subsection of the genus *Schefflera* Forst. et Forst (Araliaceae) and its composition. **Botanicheskii Zhurnal**, n. 54, p. 84-97, 1969.

GRUSHVITZKY, I. V.; SKVORTSOVA, N. T.; GLININA, L. V.; TARASOVA, T. S. Comparative anatomicomorphological investigation of the leaf in the genus *Panax* L. (Araliaceae). In: **Voprosy sravnitel'noi morfologii**. Leningrad: Nauka, 1975, p. 80-89.

HAN, L. F.; SAKAH, K. J.; LIU, L. L.; KOJO, A.; WANG, T.; ZHANG, Y. Saponins from Roots of *Panax notoginseng*. **Chinese Herbal Medicines**, v. 6, n. 2, p. 159-163, 2014.

HABERLANDT, G. **Physiological plant anatomy**. New Delhi: Today & Tomorrow's, 1990.

HO, J. C.; CHEN, C. M.; ROW, L. C. Flavonoids and Benzene Derivatives from the Flowers and Fruit of *Tetrapanax papyriferus*. **Journal of Natural Products**, n. 68, p. 1773-1775, 2005.

INANDAR, J. A.; GANGADHARA, M. Studies on the trichomes of some Euphorbiaceae. **Reprint Species Novarum Regni Vegetalili**, n. 88, v. 1-3, p. 103-111, 1977.

INUI, T.; WANG, Y.; NIKOLIC, D.; SMITH, D. C.; FRANZBLAU, S. G.; PAULI, G. F. Sesquiterpenes from *Oplopanax horridus*. **Journal of Natural Products**, n. 73, p. 563-567, 2010.

JEONG, H. Y.; MOH, S. H.; YANG, Y.; YU, T.; OH, J.; JEONG, D.; YOON, D. H.; PARK, K. M.; LEE, S.; KIM, T. W.; HONG, S.; KIM, S. Y.; CHO, J. Y. Src and Syk are targeted to an anti-inflammatory ethanol extract of *Aralia continentalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 143, p. 746-753, 2012.

JIANG, W.; LI, W.; HAN, L.; LIU, L.; ZHANG, Q.; ZHANG, S.; NIKAIDO, T.; KOIKE, K. Biologically Active Triterpenoid Saponins from *Acanthopanax senticosus*. **Journal of Natural Products**, n. 69, p. 1577-1581, 2006.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, 1940.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução a taxonomia vegetal**. 8 ed. São Paulo: Editora Nacional, 1987.

JOLY, C. A.; HADDAD, C. F. B.; VERDADE, L. M.; OLIVEIRA, M. C.; BOLZANI, V. S.; BERLINCK, R. G. S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, n. 89, p. 114-133, 2011.

KANG, S. S.; KIM, J. S.; XU, Y. N.; KIM, Y. H. Isolation of a New Cerebroside from the Root Bark of *Aralia elata*. **Journal of Natural Products**, n. 62, p. 1059-1060, 1999.

KANO, R. Vergleichende Anatomie über die Gattung *Acanthopanax* und die nahe verwandten Gattungen. **Journal of Japanese Botany**, n. 8, p. 215-268, 1936.

KIM, Y. K.; CHUNG, B. S. Pimaradiene diterpenes from *Acanthopanax koreanum*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 6, p. 1080-1083, 1988.

KOBAISY, M.; ABRAMOWSKI, Z.; LERMER, L.; SAXENA, G.; HANCOCK, R. E. W.; TOWERS, G. H. N. Antimycobacterial Polyynes of Devil's Club (*Oplopanax horridus*), a North American Native Medicinal Plant. **Journal of Natural Products**, n. 60, p. 1210-1213, 1997.

KOUGAN, G. B.; MIYAMOTO, T.; MIRJOLET, J. F.; DUCHAMP, O.; SONDEGAM, B. L.; DUBOIS, M. A. L. Arboreasides A-E, Triterpene Saponins from the Bark of *Cussonia arborea*. **Journal of Natural Products**, n. 72, p. 1081-1086, 2009.

LEE, J. H.; LEE, J. H.; LEE, Y. M.; KIM, P. N.; JEONG, C. S. Potential analgesic and anti-inflammatory activities of *Panax ginseng* head butanolic fraction in animals. **Food and Chemical Toxicology**, n. 46, p. 3749-3752, 2008.

LEE, D. Y.; SEO, K.W.; LEE, D.S.; KIM, Y. C.; CHUNG, I. S.; KIM, G. W.; CHEOI, D. S.; BAEK, N. Y. Bioactive 3,4-seco-Triterpenoids from the Fruits of *Acanthopanax sessiliflorus*. **Journal of Natural Products**, n. 75, p. 1138-1144, 2012.

LEE, H.; CHOI, J.; SHIN, S.S.; YOON, M. Effects of Korean red ginseng (*Panax ginseng*) on obesity and adipose inflammation in ovariectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 178, p. 229-237, 2016.

LIVA, R. R. H.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Clerodane and labdane diterpene glycosides from a Malagasy endemic plant, *Cussonia racemosa*. **Phytochemistry**, n. 60, p. 339-343, 2002.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer, 1970.

MARCHANT, R. *et al.* Distribution and ecology of parent taxa of pollen lodged within the Latin American Pollen Database. **Review of Paleobotany and Palynology**, n. 121, p. 1-75, 2002.

MELEK, F. R.; MIYASE, T.; KHALIK, S. M. A.; HETTA, M. H.; MAHMOUD, I. I. Triterpenoid saponins from *Oreopanax guatemalensis*. **Phytochemistry**, n. 60, p. 185-195, 2002.

MELEK, F. R.; MIYASE, T.; GHALY, N. S. Triterpenoid saponins from *Meryta lanceolata*. **Phytochemistry**, n. 62, p. 557-562, 2003.

MELEK, F. R.; MIYASE, T.; KHALIK, S. M. A.; GIND, M. R. E. Triterpenoid saponins from *Schefflera arboricola*. **Phytochemistry**, n. 63, p. 401-407, 2003.

MELEK, F. R.; MIYASE, T.; GHALY, N. S.; YOUSIF, M. F. Further saponins from *Meryta lanceolata*. **Phytochemistry**, n. 65, p. 909-914, 2004.

MELEK, F. R.; MIYASE, T.; KHALIK, S. M. A.; MAHMOUD, I. I.; MINA, S. A.; Saponins and acylated saponins from *Dizygotheca Kerchoveana*. **Phytochemistry**, n. 65, p. 3089-3095, 2004.

MENEZES, C.; SILVA, C. I.; SINGER, R. B.; KERR, W. E. Competição entre abelhas durante forrageamento em *Schefflera arboricola* (HAYATA) Merr. **Bioscience Journal**, v. 23, p. 63-69, 2007.

MENSOR, L. L., *et al.* Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Claredon press., 1950.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. 2 ed. Oxford: Claredon press., 1988.

MEYER, B. N., et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science Technology**, v.26, n.2, p.211-219, 2004.

MIGUEL, O.G. **Ensaio sistemático de análise em fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MIYAKOSHI, M.; SHIRASUNA, K.; HIRAI, Y.; SHINGU, K.; ISODA, S.; SHOJI, J.; IDA, Y.; SHIMIZU, T. Triterpenoid Saponins of *Acanthopanax nipponicus* Leaves. **Journal of Natural Products**, n. 62, p. 445-448, 1999.

NHIEM, N. X.; KIEM, P. V.; MINH, C. V.; TAI, B. H.; TUNG, N. H.; HÁ, D. T.; SOUNG, K. S.; KIM, J. H.; AHN, J. H.; LEE, L. M.; KIM, Y. H. Structure-activity relationship of lupane-triterpene glycosides from *Acanthopanax koreanum* on spleen lymphocyte IL-2 and IFN-gamma. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, n. 20, p. 4927-4931, 2010.

NJATENG, G. S. S.; DU, Z.; GATSING, D.; DONFACK, A. R. N.; TALLA, M. F.; WABO, H. K.; TANE, P.; MOUOKEU, R. S.; LUO, X.; KUIATE, J. R. Antifungal properties of a new triterpenoid saponin and other compounds from the stem bark of *Polyscias fulva* Hiern (Araliaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

O'BRIEN, T.P, FEDER, N., MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

OLIVEIRA, F., AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2 ed. Atheneu. São Paulo, 1997.

OREOPANAX FULVUS MARCHAL. Disponível em:<
<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-143530>>. Acesso em: 17 abril 2016.

OREOPANAX FULVUS MARCHAL. Disponível em:<
<http://cncflora.jbrj.gov.br/porta/pt-br/profile/Oreopanax%20fulvus>>. Acesso em: 17
 abril 2016.

OSTROUMOVA, T. A.; OSKOLSKI, A. A. Survey of the leaf anatomy of Araliaceae and some related taxa. **Plant Diversity and Evolution**, v. 128, n. 3-4, p. 423-441, 2010.

PAPHASSARANG, S.; RAYNAUD, J.; LUSSIGNOL, M. Triterpenoid saponins from *Polyscias scutellaria*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 2, p. 239-242, 1989.

PAPHASSARANG, S.; RAYNAUD, J.; LUSSIGNOL, M. A new oleanolic glycoside from *Polyscias scutellaria*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 1, p. 163-166, 1990.

PARK, S. Y.; CHANG, S. Y.; YOOK, C. S.; NOHARA, T. New 3,4-seco-Lupane-Type Triterpene Glycosides from *Acanthopanax senticosus* forma *inermis*. **Journal of Natural Products**, n. 63, p. 1630-1633, 2000.

PENG, L. Y.; XU, G.; HE, J.; WU, X. D.; DONG, L. B.; GAO, X.; CHENG, X.; SU, J.; LI, Y.; DONG, W. M.; ZHAO, Q. S. Nor-lupane triterpenoid and guaiane sesquiterpenoids from *Schefflera venulosa*. **Fitoterapia**, n. 103, p. 294-298, 2015.

PEREIRA, R. C.; ROQUE, F. O.; CONSTANTINO, P. A. L.; PRADO, M. U. **Monitoramento in situ da biodiversidade: Proposta para um Sistema Brasileiro de Monitoramento da Biodiversidade**. Brasília/DF: ICMBio, 2013.

PINTO, M. B. **Fenologia, estrutura e distribuição espacial de duas populações de *Oreopanax fulvum* Marchal (Araliaceae) no Paraná**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

POLYA, G. M. **Biochemical targets of plant bioactive compounds: a pharmacological reference guide to sites of action and biological effects.** Florida: CRS Press, 2003.

POTDUANG, B.; CHONGSIRIROEG, C.; BENMART, Y.; GIWANON, R.; SUPATANAKUL, W.; TANPANICH, S. Biological Activities Of Schefflera leucanta. **African Journal of Traditional**, v. 4, n. 2, p. 157-164, 2007.

PRETE, P. S. C.; MALHEIROS, S. V. P.; DE PAULA, E. Quantitative assessment of humam erythrocyte membrane solubilization by Triton X-100. **Biophysical Chemistry**, v. 97, p. 1-5, 2002.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamina E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PRESCOTT, T. A. K.; RIGBY, L. P.; VEITCH, N. C.; SIMMONDS, M. S. J. The haploinsufficiency profile of alfa-hederin suggests a caspofungin-like antifungal mode of action. **Phytochemistry**, n. 101, p. 116-120, 2014.

QUANG, T. H.; NGAN, N. T. T.; MINH, C. V.; KIEM, P. V.; NHIEM, N. X.; TAI, B. H.; THAO, N. P.; TUNG, N. H.; SONG, S. B.; KIM, Y. H. Anti-inflammatory Triterpenoid Saponins from the Stem Bark of Kalopanax pictus. **Journal of Natural Products**, n. 74, p. 1908-1915, 2011.

RASOOL, S.; KHAN, F. Z.; HASSAN, S.; AHMED, M.; AHMED, M.; TAREEN, R.B. Anticonvulsant, antimicrobial and cytotoxic activities of Berberis calliobotrys Aitch ex Koehne (Berberidaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 11, p. 2031-2039, 2015.

RHO, M. C.; LEE, H. S.; LEE, S. W.; CHANG, J. S.; KWON, O. E.; CHUNG, M. Y.; KIM, Y. K. Polyacetylenic Compounds, ACAT Inhibitors from the Roots of *Panax ginseng*. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, n. 53, p. 919-922, 2005.

RICHTER, R.; BASAR, S.; KOCH, A.; KONIG, W. A. Three sesquiterpene hydrocarbons from the roots of *Panax ginseng* C. A. Meyer (Araliaceae). **Phytochemistry**, n. 66, p. 2708-2713, 2005.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v. 61, n.2, p. 33-36, 1972.

ROCHA, F. F.; ALMEIDA, C. S.; SANTOS, R. T.; SANTANA, S. A.; COSTA, E. A.; PAULA, J. R.; VANDERLINDE, F. A. Anxiolytic-like and sedative effects of *Hydrocotyle umbellata* extract in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 21, p. 115-120, 2011.

SANTORO, M. J. Avaliação de *Hedera helix* como expectorante em pacientes com tosse produtiva - estudo multicêntrico com avaliação de 5.850 pacientes. **Revista Brasileira Médica**, n. 62, p. 47-42, 2005.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2 ed. Iowa State College, Ames, 1951.

SAUERESSIG, D. **Levantamento dendrológico na floresta ombrófila mista e implementação de um sistema de identificação "online"**. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SHABBIR, M.; KHAN, M. R.; SAEED, N. Assessment of phytochemicals, antioxidant, anti-lipid peroxidation and anti-hemolytic activity of extract and various fractions of *Maytenus royleanus* leaves. **Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

SILVA, C. B.; SIMIONATTO, E.; HESS, S. C.; PERES, M. T. L. P.; SIMIONATTO, E. L.; JÚNIOR, A. W.; POPPI, N. R.; FACCENDA, O. D.; CÂNDIDO, A. C. S.; SCALON, S. P. Q. Composição química e atividade alelopática do óleo volátil de *Hydrocotyle bonariensis* LAM (ARALIACEAE). **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2373-2376, 2009.

SKVORTSOVA, N. T.; AVERYANOV, L. V. A new genus and species – *Grushvitzkya stellata* (Araliaceae) from the North Viet-Nam. **Botanicheskii Zhurnal**, n. 79, v. 7, p. 108-112, 1994.

SRIVASTAVA, S. K. An acetylated saponin from *Schefflera impressa*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 6, p. 1342-1344, 1989.

SRIVASTAVA, S. K. A new triterpenic acid from *Schefflera impressa*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 3, p. 298-302, 1992.

SULEYMAN, H.; MSHVILDADZE, V.; GEPIREMEN, A.; ELIAS, R. Acute and chronic antiinflammatory profile of the ivy plant, *Hedera helix*, in rats. **Phytomedicine**, n. 10, p. 370-374, 2003.

SUNG, T. V. An acetylated bidesmosidic saponin from *Schefflera octophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 4, p. 503-505, 1992.

TAPONDJOU, L. A.; LONTSI, D.; SONDEGAM, B. L.; SHAHEEN, F.; CHOUDHARY, M. I.; RAHMAN, A. U.; HEERDAN, F. R. V.; PARK, H. J.; LEE, K. T. Saponins from *Cussonia bancoensis* and Their Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production. **Journal of Natural Products**, n. 66, p. 1266-1269, 2003.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical Dictionary: A handbook of bioactive compounds of plants**. 2. ed. Wallington: Taylor and Francis, 1999.

TOMMASI, N.; PIZZA, C.; BELLINO, A.; VENTURELLA, P. Triterpenoid Saponins from *Trevesia sundaica*. **Journal of Natural Products**, n. 60, p. 1070-1074, 1997.

TOMMASI, N.; PIZZA, C. Triterpenoid Saponins from *Schefflera divaricata*. **Journal of Natural Products**, n. 60, p. 663-668, 1997.

TOMMASI, N.; AUTORE, G.; BELLINO, A.; PINTO, A.; PIZZA, C.; SORRENTINO, R.; VENTURELLA, P. Antiproliferative Triterpene Saponins from *Trevesia palmata*. **Journal of Natural Products**, n. 63, p. 308-314, 2000.

VALKAMA, E.; SALMINES, J. P.; PIHLAJA, K. Comparative analysis of leaf trichome structure and composition of epicuticular flavonoids in finnish birch species. **Annals of Botany**, n. 91, p. 643-655, 2003.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. **Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp.** In: I. A. Nascimento, E. C. P. M., Sousa & M. Nipper (ed.), Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo, p.111-122, 2002.

WAGNER, H. **Plant Drugs analysis**. 2 ed. Berlin: Springer, p. 298-299 e 319-319, 1996.

WANG, J.; LI, S.; FAN, Y.; CHEN, Y.; LIU, D.; CHENG, H.; GAO, X.; ZHOU, Y. Anti-fatigue activity of the water-soluble polysaccharides isolated from *Panax ginseng* C.A. Meyer. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 130, p. 421-423, 2010.

WANG, Y.; WANG, L.; WANG, W. J.; ZHANG, X. Q.; TIAN, H. Y.; ZHANG, Q. W.; LI, Y. L.; YE, W. C. New triterpenoid saponins from the aerial parts of *Shefflera kwangsiensis*. **Carbohydrate Research**, n. 385, p. 65-71, 2014.

WEN, J.; LEE, C.; LOWRY, P. P.; HIEP, N. T. Inclusion of the Vietnamese endemic genus *Grushvitzkya* in *Brassaiopsis* (Araliaceae): evidence from nuclear ribosomal ITS and chloroplast *ndh F* sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 4, v. 142, p. 455-463, 2003.

WU, Z. Y.; ZHANG, Y. B.; ZHU, K. K.; LUO, C.; ZHANG, J. X.; CHENG, G. R.; FENG, R. H.; YANG, W. Z.; ZENG, F.; WANG, Y.; XU, P. P.; GUO, J. L.; LIU, X.; GUAN, S. H.; GUO, D. A. Anti-inflammatory Diterpenoids from the Root Bark of *Acanthopanax gracilistylus*. **Journal of Natural Products**, n. 77, p. 2342-2351, 2014.

YE, X.; YU, S.; LIAN, X. Y.; ZHANG, Z. Quantitative determination of triterpenoid glycosides in *Fatsia japonica* Decne and Planch using high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 88, p. 472-476, 2014.

YANG, M. C.; KWON, H. C.; KIM, Y. J.; LEE, K. R.; YANG, H. O. Oploxynes A and B, Polyacetylenes from the Stems of *Oplopanax elatus*. **Journal of Natural Products**, n. 73, p. 801-805, 2010.

YOSHIZUMI, K.; HIRANO, K.; ANDO, H.; HIRAI, Y.; IDA, Y.; TSUJI, T.; TANAKA, T.; SATOUCHI, K.; TERAOKA, J. Lupane-Type Saponins from Leaves of *Acanthopanax sessiliflorus* and Their Inhibitory Activity on Pancreatic Lipase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 54, p. 335-341, 2006.

YU, S.S.; YU, D. Q.; LIANG, X. T. Triterpenoid saponins from the roots of *Aralia spinifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 7, p. 978-982, 1994.

XIAO, K.; YI, Y. H.; WANG, Z. Z.; TANG, H. F.; LI, Y. Q.; LIN, H. W. A Cytotoxic Triterpene Saponin from the Root Bark of *Aralia dasycarpa*. **Journal of Natural Products**, n. 62, p. 1030-1032, 1999.

ZHU, M. Four New Triterpene Glycosides from *Schefflera bodinieri* Roots. **Journal of Natural Products**, n. 59, p. 1043-1046, 1996.

ANEXO 1

DECLARAÇÃO DE DEPÓSITO DE EXSICATA



Prefeitura Municipal de Curitiba
Secretaria Municipal do Meio Ambiente
Departamento de Produção Vegetal
Divisão do Museu Botânico Municipal
Herbário MBM

DECLARAÇÃO

Declaro para os fins que se fizerem necessários que se encontra tombada no herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM), uma exsicata de planta pertencente à família Araliaceae, cujo nome científico é *Oreopanax fulvum* Marchal Pers., coletada na localidade Capão do Cifloma, UFPR, Município de Curitiba, Estado do Paraná, Brasil, coordenadas geográficas 25°26'48"S e 49°14'22", por Camila Cristina de Jesus, em 08/04/2016, depositada por Camila Cristina de Jesus. A referida exsicata foi identificada por Motta, J.T., em 12/04/2016, e encontra-se depositada no Herbário MBM sob o n° de registro **MBM-389669**, estando à disposição e podendo ser consultada para todas e quaisquer eventualidades.

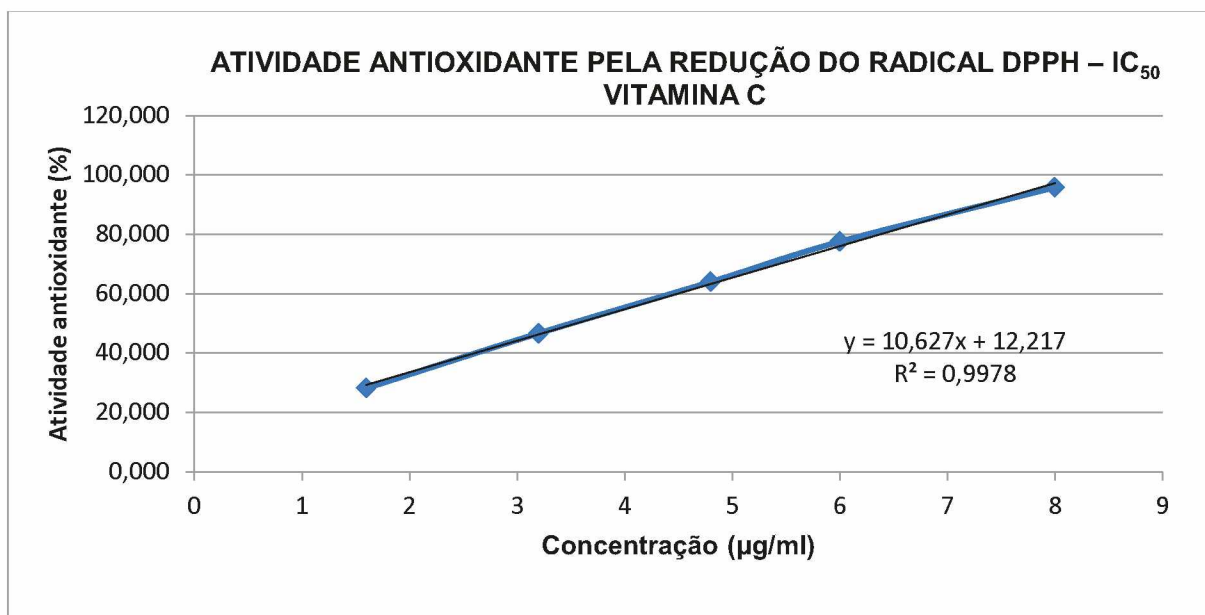
Curitiba, 14 de julho de 2016

José Tadeu Weidlich Motta
Curador do Herbário MBM
Matr. 35721

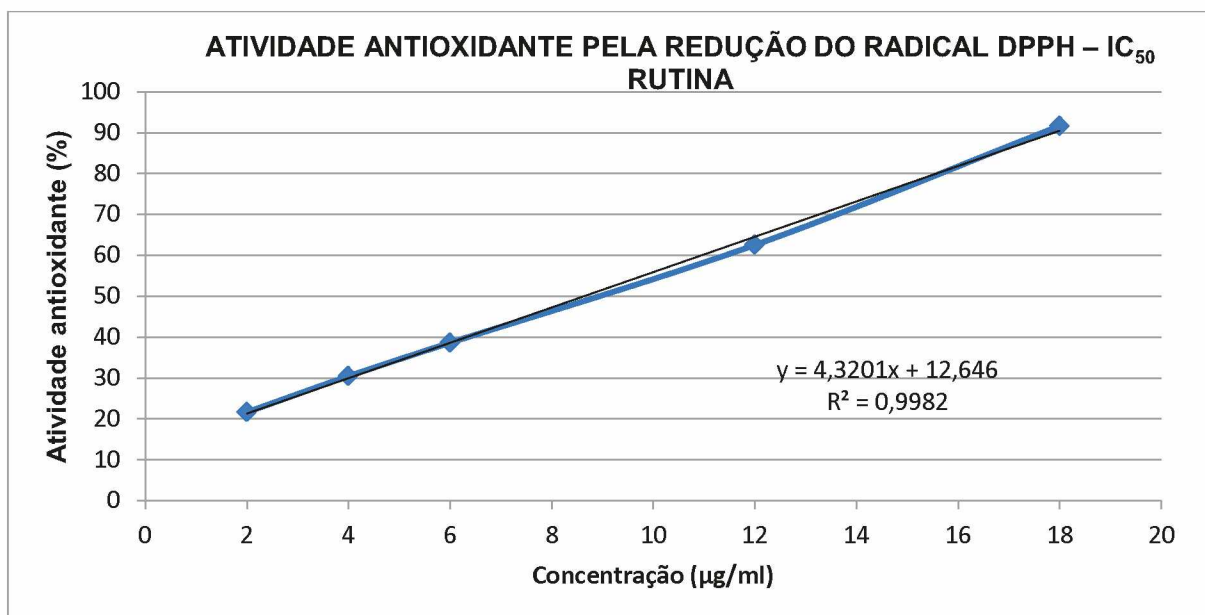
ANEXO 2

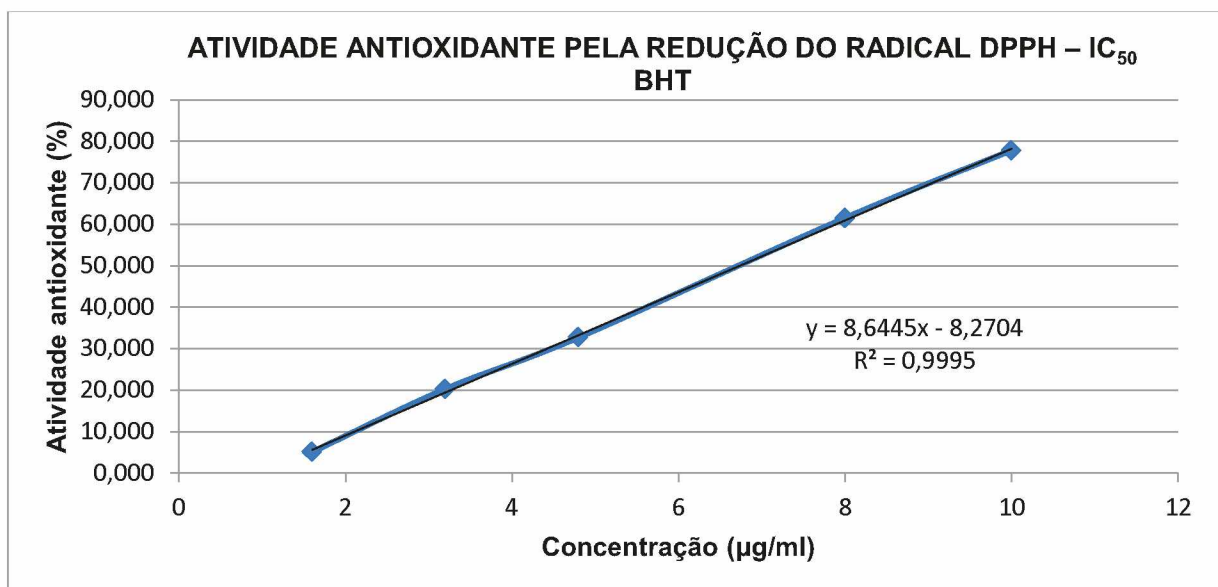
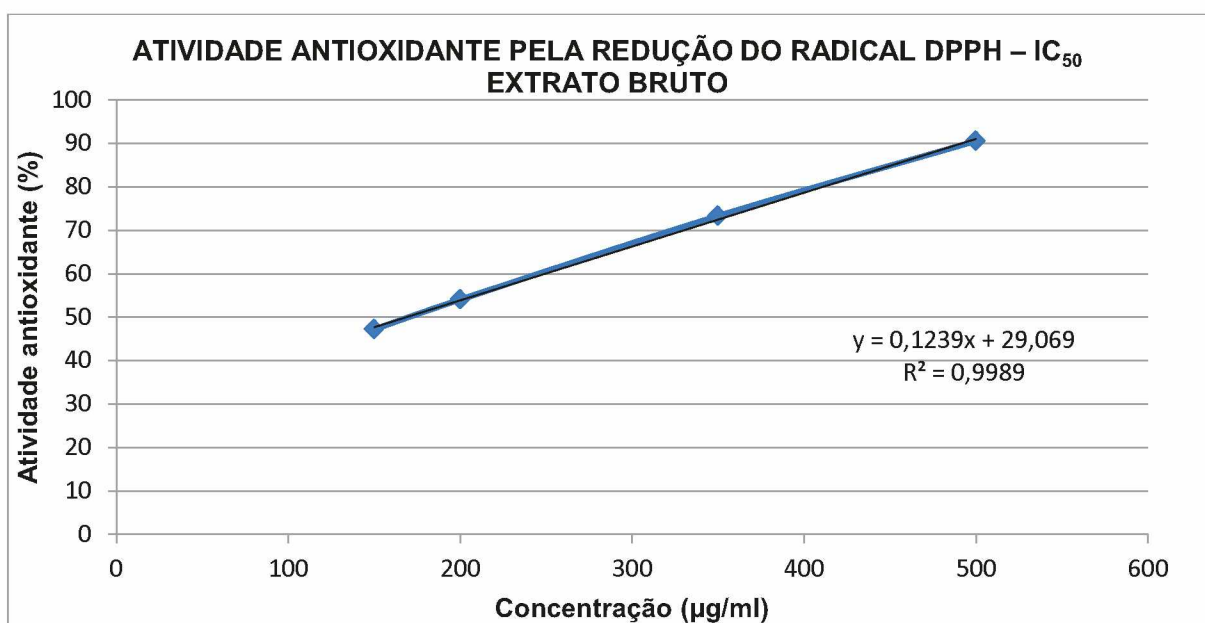
CURVAS DE CALIBRAÇÃO DPPH

RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH – IC₅₀
VITAMINA C

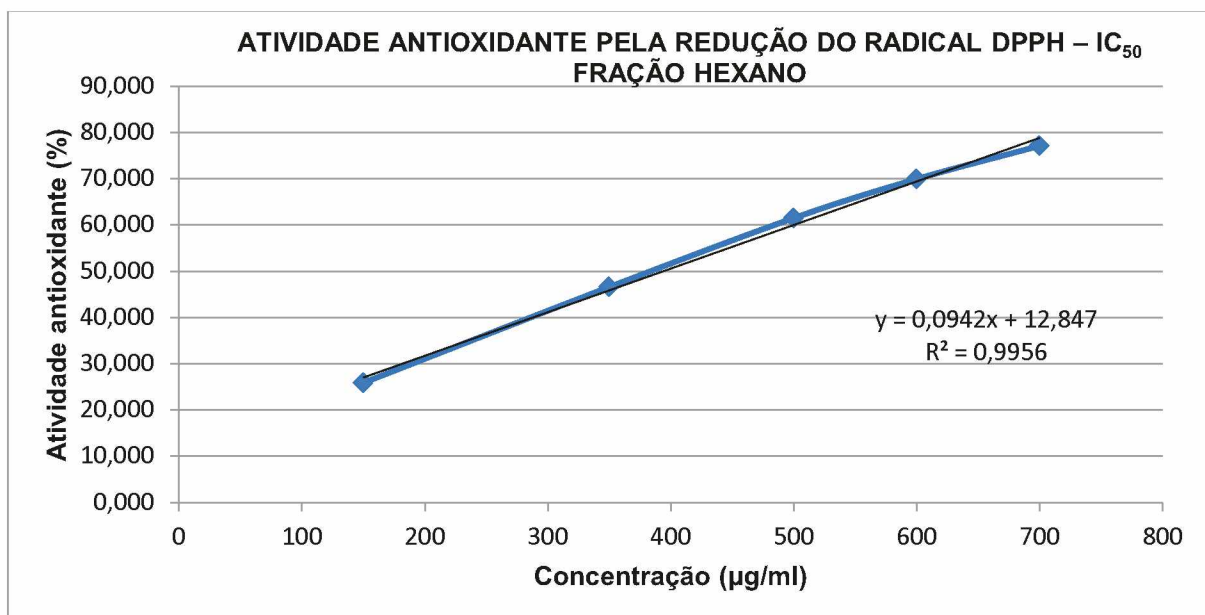


RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH – IC₅₀
RUTINA

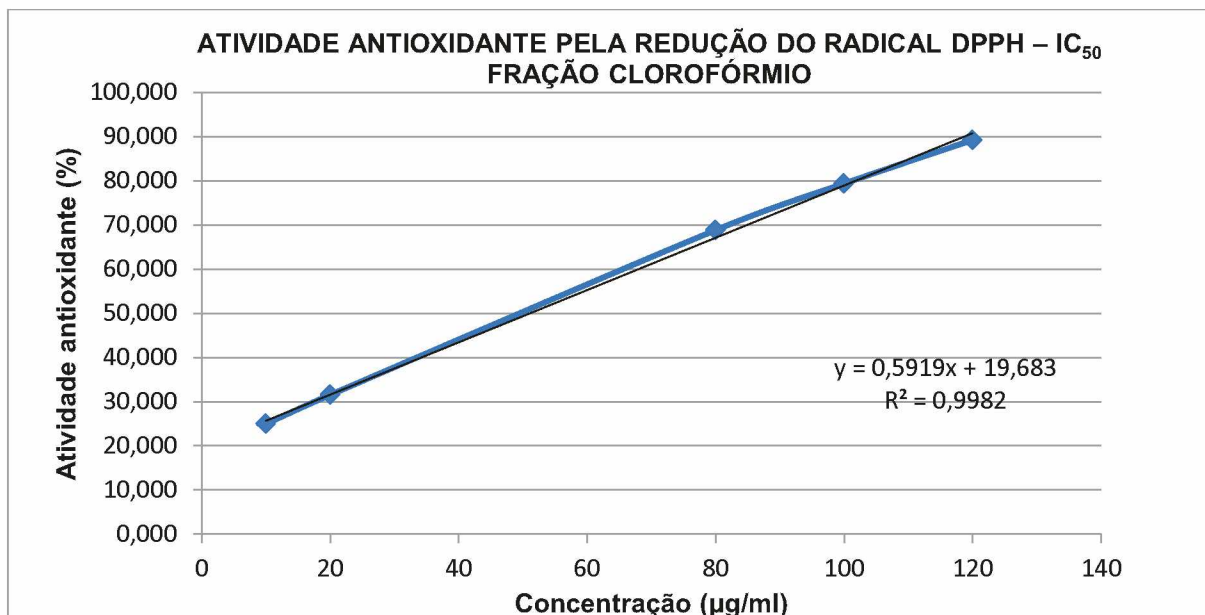


RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH – IC₅₀ BHTRESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH – IC₅₀ EXTRATO BRUTO

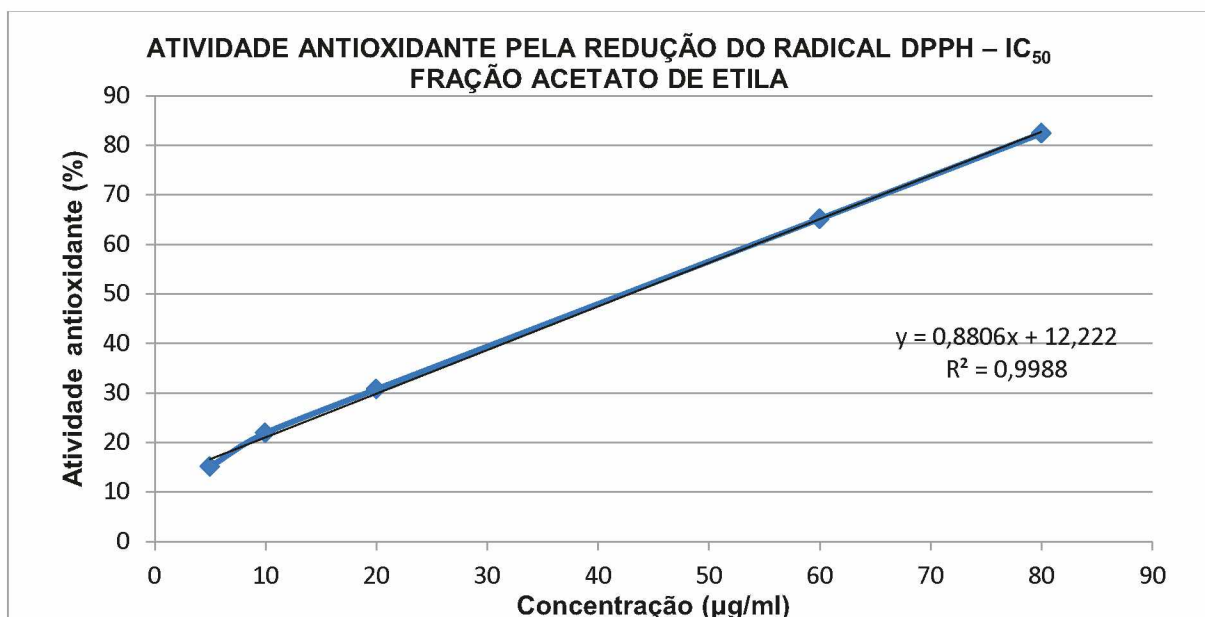
RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH – IC₅₀
FRAÇÃO HEXANO



RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH – IC₅₀
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO



RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH – IC₅₀
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA



RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH – IC₅₀
FRAÇÃO REMANESCENTE

